THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS VII

par

Matthieu RICARD

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences

Sujet de la thèse : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA DIVISION CELLULAIRE CHEZ **E. COLI** K12

Soutenue le ..... 1973 ..... *devant la Commission d'Examen*

MM. J.M. DUBERT Président
G. BUTTIN Examinateurs
F. JACOB

THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS VII

par

Matthieu RICARD

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences

Sujet de la thèse : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA DIVISION CELLULAIRE CHEZ **E. COLI** K12

Soutenue le ..... *devant la Commission d'Examen*

MM. J.M. DUBERT Président
G. BUTTIN Examinateurs
F. JACOB

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INTRODUCTION

L'étude des microorganismes a permis à la biologie moléculaire de décrire au cours des années passées quelques-uns des aspects majeurs du métabolisme cellulaire, dont notamment la transmission de l'information héréditaire, l'expression et le maintien d'une fonction enzymatique, etc... Ces aspects concernaient pour la plupart des fonctions particulières dont l'étude pouvait être circonscrite de façon plus ou moins aisée. Le processus de la division cellulaire en revanche fait intervenir un nombre considérable de fonctions de natures diverses qui peuvent agir soit en parallèle, soit de façon séquentielle. La plus grande partie des fonctions cellulaires étant en relation plus ou moins directe avec le phénomène de la division, il convenait donc d'aborder cette étude de telle sorte que l'on puisse repérer parmi les autres fonctions celles qui font partie intégrante du mécanisme de la division. Dans ce sens, l'usage de la génétique s'avère extrêmement précieux puisqu'il permet, en isolant des mutants, de détecter des fonctions dont l'altération se traduit par l'arrêt de la division à l'exclusion de tout

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552718_0010

autre désordre apparent (lyse, arrêt de la croissance, de la respiration,etc...)

L'usage des bactéries dont la génétique est très bien connue et dont le temps de génération est le plus court qui soit, s'imposait donc pour cette étude.

Nous allons maintenant considérer le cycle de la division cellulaire de l'organisme que nous avons choisi comme matériel d'étude, la bactérie d'Escherichia coli K12.

Un certain nombre d'étapes ont d'ores et déjà été repérées dans le déroulement de ce cycle dans une cellule qui contient un ou deux noyaux, le DNA est répliqué puis la cellule s'allongeant, les copies de DNA nouvellement synthétisées se séparent progressivement les unes des autres. Finalement, un septum apparaît au niveau du plan équatorial de la cellule, ce qui conduit à la formation de deux cellules filles, chacune d'elles recevant la moitié du DNA maternel (Robinow, 1960).

Pour que les cellules se reproduisent de façon identique à elles-mêmes, il est indispensable qu'un système de régulation coordonne le déroulement de ce processus. Selon un modèle proposé en 1963 par Jacob, Brenner et Cuzin, le chromosome bactérien constitue une unité de réplication autonome, ou "réplicon" qui porte les déterminants génétiques nécessaires à la régulation de sa propre duplication. Les autres molécules de DNA qui se multiplient dans

une bactérie, les épisomes et les bactériophages constituant autant de réplicons distincts.

L'existence de réplicons autonomes est attestée par la possibilité d'obtenir des mutations qui affectent spécifiquement la synthèse d'un seul type de réplicon.

D'après le modèle de Jacob, Brenner et Cuzin, le réplicon gouvernerait sa duplication grâce à l'intervention d'au moins deux éléments génétiques : "un initiateur" cytoplasmique dont la synthèse est dirigée par un gène de structure du réplicon considéré et un "réplicateur", gène régulateur qui permet le commencement de la synthèse du DNA après avoir reçu un signal de l'initiateur.

En provoquant la mise en route du système de réplication, l'initiateur exercerait d'une certaine façon un contrôle de type positif, par opposition aux systèmes de contrôle de type négatif chez lesquels un répresseur cytoplastique bloque la transcription d'un groupe de gènes en se combinant au gène opérateur.

L'analyse de mutants bactériens incapables de synthétiser du DNA montre qu'il existe bien deux types de fonctions qui assurent les unes le déclenchement de la réplication du DNA, les autres la réplication proprement dite. On connaît, en effet, des mutants conditionnels thermosensibles qui placés à haute température, terminent le cycle de réplication du DNA en cours, mais ne peuvent en entreprendre un nouveau (mutants du type dnaA et dnaC,

Hirota, Ryter et Jacob, I968 ; Hirota, Mordoh et Jacob,I970; Carl, I970). Dans ce cas, c'est donc le système qui permet de déclencher la réplication qui est défectueux.

Ce défaut peut être pallié par l'introduction dans le chromosome bactérien d'un système équivalent provenant d'un autre réplicon. Le chromosome bactérien peut alors se répliquer mais il est soumis à un système de régulation étranger. Ce phénomène dit de "suppression par intégration" a été mis en évidence à l'aide de divers épisomes F' (Nishimura, Caro, Berg et Hirota, I971), du phage PI (Nishimura, et Caro, in Gross, 1971) et d'un mutant du phage P2 (Lindahl, Hirota et Jacob, I971). Il démontre à l'évidence l'existence des unités de contrôle (réplicons) et leur spécificité.

On connaît par ailleurs un nombre important de mutants qui arrêtent immédiatement de synthétiser du DNA lorsqu'ils sont placés à haute température (type DnaB, D, E, G in Gross, I971). Chez ces mutants, c'est l'élongation de la chaîne du DNA qui est inhibée. Dans un cas (mutant dnaE) cette lésion a pu être rapportée à la thermosensibilité d'un enzyme de réplication, la DNA- polymérase III (Gefter, Hirota, Kornberg, Wechsler et Barnoux, I971).

Si l'on considère maintenant la ségrégation des chromosomes nouvellement synthétisés, on comprend qu'il doive exister non seulement un mécanisme précis réglant la dupli-

cation du chromosome par rapport à la croissance et à la division cellulaire, mais également un mécanisme qui assure une répartition égale des copies de DNA entre les cellules filles.

Le chromosome bactérien ne présente pas de structures semblables à l'appareil mitotique des noyaux des organismes supérieurs. Toutefois, d'après une hypothèse proposée par Jacob, Brenner et Cuzin (1963), l'attachement du chromosome à l'enveloppe cellulaire pourrait permettre de coordonner d'une façon simple et précise la réplication du DNA, la répartition des copies, l'élongation de la cellule et sa division. Selon cette hypothèse, la séparation des copies de DNA serait assurée par la croissance de l'enveloppe cellulaire entre les sites d'attachement des chromosomes à la membrane. Cette croissance devrait donc s'effectuer préférentiellement au niveau de la zone équatoriale et non pas de façon uniforme en tout point de la cellule.

De nombreux points de ce modèle ont été maintenant confirmés par l'expérience.

Chez les bactéries du type gram+ tout d'abord, l'existence d'une zone de croissance équatoriale a pu être mise en évidence de façon très claire, notamment chez Diplococcus pneumoniae (Briles et Tomasz 1970) ; Mosser et Tomasz, 1970) et chez Septococcus faecalis (Swanson, Hsu et Gottschlich, 1969) ; Higgins et Schockmann 1971) par des techniques d'immunofluorescence et de marquages radioactifs.

Chez les bactéries de type gram⁻ , la croissance de l'enveloppe semble s'accompagner d'une redistribution rapide et homogène des lipides et des protéines par simple diffusion latérale (Overath, Hill et Lamnek, I971 : Frye et Edidin, I970). Dans ces conditions, il est évidemment plus difficile de déterminer le monde de croissance "instantané" de l'enveloppe. Un résultat positif a toutefois été obtenu en étudiant la croissance du sacculus, macromolécule de muréine qui entoure complètement la cellule et constitue la paroi cellulaire.L'autoradiographie de sacculi isolés à partir de cellules ayant reçu un marquage bref d'acide diaminopimélique tritié, un constituant de la muréine, a montré en effet que la radioactivité était incorporée presque exclusivement au niveau de la zone équatoriale (Ryter, Hirota et Schwarz, en préparation). Puis les éléments ainsi incorporés localement semblent se répartir ensuite de façon homogène dans l'intervalle d'une demi-génération.

L'attachement du chromosome à l'enveloppe cellulaire par l'intermédiaire d'un mésonome a été clairement mis en évidence chez Bacillus Subtilis à la suite d'observations cytologiques en microscopie électronique. Chez E.Coli l'absence, ou l'extrême rareté des mésosomes a rendu difficile la confirmation de ces observations ; toutefois, l'attachement du DNA à la membrane apparaît sans ambiguité lorsqu'on examine, non pas des cellules intactes, mais des sphéroplastes (Ryter & Jacob, I966 ; Ryter, I968).

Plusieurs auteurs ont également isolé du DNA associé à des fragments de membrane de B.subtilis et d'E.coli présentant une densité de flottaison différente dans des gradients de sucrose ou de chlorure de césium (Ganesan et Lederberg, I965 ; Ganesan, I968 ; Smith et Hanawalt, I968 ; Sueoka et Quinn, I968 ; Fuchs et Hanawalt, I971 ; Fielding et Fox, I970; Korn et Thomas, I971). Toutefois, la nature de cet attachement n'est pas entièrement claire, puisqu'on ne sait pas avec certitude si le site d'attachement coïncide avec le site de réplication (Ganesan, I968 ; Smith et col. I967 ; Fuchs et col. I971) ou si, au contraire, c'est le DNA qui est attaché en un point fixe et le site de réplication qui se déplace le long du chromosome (Sueoka et col., I968).

D'autres résultats semblent également plaider en faveur de l'hypothèse qui confère à la membrane un rôle dans la régulation des synthèses macromoléculaires. Certains mutants de type dnaA et dnaB notamment, qui arrêtent de synthétiser du DNA à haute température, présentent des modifications au niveau de la composition protéique de leurs membranes (dnaA Shapiro, Siccardi, Hirota et Jacob, I970 ; dnaB Inouye et Gutherie, I969 ; Inouye et Pardee, I970 ; Siccardi et col., I971) Toutefois, il est impossible de dire à l'heure actuelle si ces modifications entraînent par elles-mêmes l'arrêt de la synthèse du DNA ou si elles ne sont qu'un effet secondaire de cet arrêt.

Par ailleurs, certaines propriétés du mutant CRT46 de type dnaA, reflètent indiscutablement l'existence d'une altération de la membrane cellulaire : il s'agit notamment d'une sensibilité accrue à l'égard d'un détergent, le déoxycholate de sodium, et d'une modification de structure qui permet à un marqueur fluorescent, l'ANS (voir p. 47) d'accéder plus facilement aux sites hydrophobes des protéines membranaires (Hirota, Mordoh et Jacob, 1971).

Ces exemples variés renforcent donc l'idée que l'on peut avoir du rôle régulateur de la membrane dans la coordination du processus de multiplication cellulaire.

Indépendamment de l'intervention éventuelle de la membrane, on sait à l'heure actuelle qu'il existe une relation chronologique précise entre le cycle de réplication du DNA et la division de la cellule. Nous décrirons brièvement ci-dessous les rapports qui existent entre le taux de croissance, la réplication du DNA et la division cellulaire.

En 1966, Maaløe et Kjeldgaard ont émis l'hypothèse que la vitesse de réplication du chromosome était constante. En d'autres termes, quel que soit le temps de génération des cellules, le temps qu'il faut à un point de réplication pour parcourir tout le chromosome est toujours le même. On sait par ailleurs que la quantité de DNA par cellule varie avec le taux de croissance. Maaloe et Kjeldgaard ont donc proposé

que lorsque le temps de génération devenait inférieur au temps de réplication du DNA, il devait apparaître sur le chromosome des points de réplication multiples. Un nouveau cycle de réplication étant ainsi entrepris avant que le cycle précédent ne soit achevé. Par ce moyen, la transmission des chromosomes aux descendants peut être réglée correctement dans des conditions de croissance diverses. De fait, l'existence de points de réplication multiples a été révélée pour la première fois chez B.subtilis (Yoskihawa, O'Sullivan et Sueoka, I964), et confirmée par la suite chez E.coli (Helmstetter et Cooper, I968).

D'après Cooper et Helmstetter (1968), une deuxième constante existerait dans le cycle cellulaire, à savoir le temps qui s'écoule entre la fin d'un cycle de réplication du DNA et la division de la cellule. Des études cinétiques du taux de synthèse du DNA et de la division cellulaire chez E.coli B/r ont en effet montré que la durée du cycle de réplication du DNA était toujours de 40 min. et que la division de la cellule survenait toujours 20 min. après la fin d'un cycle de réplication.

Lorsque par exemple, le temps de génération (qui dépend des conditions de croissance) est égal à 40 min., la fin d'un cycle de réplication coïncide avec le commencement du suivant et se produit 20 min. avant la division, c'est-à-dire au milieu du cycle cellulaire. Dans ce cas,

la cellule contient donc en permanence la valeur d'un chromosome et demi. Si le temps de génération est supérieur à 40 min. la cellule arrêtera de synthétiser du DNA pendant un certain laps de temps. Si en revanche, le temps de génération est inférieur à 40 min., il faut qu'un nouveau cycle de DNA commence avant que le processus ne soit achevé.

Il découle de ces observations que le temps de génération ne peut être inférieur à 20 min., conditions dans lesquelles un cycle de réplication se termine juste après la division, ce qui permet aux cellules de se diviser à nouveau 20 min. plus tard.

Puisqu'il existe une relation chronologique précise entre le cycle de réplication du DNA et la division, il semble donc intéressant d'examiner l'effet produit sur la division par un arrêt de la synthèse du DNA et vice-versa.

Cet examen montre que s'il est possible d'arrêter la division cellulaire d'E.coli sans pour autant inhiber la synthèse du DNA (Van de Putte et coll., 1964), en revanche, l'arrêt de la synthèse du DNA se traduit à brève échéance par l'arrêt de la division : ayant inhibé la synthèse du DNA par l'action du rayonnement ultraviolet, de la mitomycine C ou de l'acide nalidixique, Helmstetter et Pierucci (1968) ont démontré que la division résiduelle que l'on pouvait observer dans ces conditions était le fait des cellules qui avaient terminé un cycle de réplication

avant que le traitement inhibiteur ne leur ait été appliqué. Clarck (1968), utilisant une culture synchronisée d'E.coli B/r, a également montré qu'une inhibition de la synthèse du DNA en début du cycle de réplication n'était suivie d'aucune division résiduelle, tandis qu'une inhibition en fin du cycle de réplication permettait aux cellules de se diviser une fois encore.

On peut donc conclure de ces expériences qu'un évènement survenant en fin de cycle de réplication du chromosome est indispensable à l'expression de la division cellulaire. Cet évènement peut représenter la fin de la réplication en tant que telle, ainsi que l'ont proposé les auteurs cités plus haut ; mais il peut aussi être d'une autre nature et consister par exemple en un doublement des copies d'un ou de plusieurs gènes situés dans la partie terminale du chromosome.

L'existence d'un contrôle de la réplication du DNA sur la division cellulaire est également attestée au niveau génétique par la possibilité d'obtenir des mutants qui semblent échapper à ce contrôle. Les mutations correspondantes, nommées div, permettent la formation de septum aux extrémités des cellules filamenteuses qui sont produites lorsque la synthèse ou la répartition des chromosomes est arrêtée. Ces divisions conduisent généralement à la forma-

tion de cellules annucléées. Plusieurs classes de mutations de ce genre ont été décrites (chapitre 5) (Hirota, Ryter et Jacob, I968 ; Hirota, Jacob, Ryter, Buttin et Nakai, I968 ; Inouye I969, Inouye, 1971 ; Hirota et Ricard, 1972).

Au cours de cette introduction, nous avons donc présenté une image du cycle cellulaire d'E.coli.On remarquera que c'est la duplication du chromosome, sa régulation et les incidences qu'elle peut avoir sur les autres processus du cycle cellulaire qui ont fait l'objet du plus grand nombre de travaux.

Restent les dernières étapes du cycle de division, la formation du septum et la séparation des cellules. Peu d'études leur ont été consacrées en propre et leur mécanisme reste incompris. C'est sur ce sujet que nous avons entrepris de travailler.

De nombreuses étapes pouvant intervenir dans ce phénomène (transmission de signaux régulateurs, détermination du site de division, clivage de l'enveloppe, invagination de la membrane synthèses diverses, séparation des cellules...) nous devions donc l'approcher par une voie qui permette d'en détailler les éléments.

Nous avons choisi pour cela d'isoler et d'étudier un nombre relativement élevé de mutants conditionnels d'E.coli qui sont incapables de se diviser à haute température, tout en poursuivant leur croissance. Par ce procédé, trois types

de mutants ont été obtenus jusqu'à maintenant : des mutants de type dna, qui arrêtent de synthétiser leur DNA et dont on connaît déjà de nombreux représentants (Gross, 1971), des mutants de type par (Hirota, Ryter et Jacob, 1968 ; Hirota, Ricard et Shapiro, I971) qui sont incapables d'assurer la partition des chromosomes et enfin des mutants de type fts qui, tout en continuant à croître normalement, ne peuvent former de septum intercellulaire.

C'est donc cette dernière catégorie de mutants que nous recherchions plus particulièrement. Leur altération se traduit par la formation de longues cellules filamenteuses multinucléées. Quelques mutants de ce genre étaient déjà connus, à savoir :

a) deux classes de mutants thermosensibles de type fts (ftsA et ftsB) qui, normaux à 30°, forment des filaments multinucléés à haute température (Van de Putte, Van Dillewijn et Rörsch, I964 ; Kohiyama, Cousin, Ryter et Jacob, I966 ; Hirota, Ryter et Jacob, I968 ; Ricard et Hirota I969).

b) quelques mutants de type fts non identifiés (Reeves, Groves et Clark, I970 ; Nagai, Kaneko et Tamura, I971).

c) des mutants de type lon qui forment des filaments multinucléés après avoir reçu de faibles doses de rayonnement ultra-violet (Howard-Flanders, Simon et Thériot, I964 ; Adler et Hardigree, 1964 ; Walker et Pardee, 1967).

Dans ce mémoire, nous présenterons l'identification de sept gènes distincts de type fts (ftsA, B, C, D, E, F et G) qui, à l'état muté, conduisent tous à la formation de filaments multinucléés dont les propriétés seront examinées.

La collection de mutants que nous avons isolés a également permis de caractériser un nouveau gène de type par, le gène parB et d'obtenir des mutants des types dna et parA.

Parallèlement, et en raison de l'intérêt que suscite l'étude du rôle de la membrane dans le cycle cellulaire, nous avons constitué et examiné une collection de mutants présentant des altérations de la membrane.

Enfin, dans le cours de notre étude, un effet de certains agents sur l'expression phénotypique de mutations présumées de type "faux-sens" a été mis en évidence et caractérisé chez E.coli.

SOMMAIRE

INTRODUCTION ... I

Sommaire ... XV

MATERIEL et METHODES ... 1

Chapitre 1

ISOLEMENT DE MUTANTS INCAPABLES DE SE DIVISER ... 14
Mutants thermosensibles. Colorations nucléaires. Microscopie électronique.

Chapitre 2

ETUDE GENETIQUE ... 18

A/ Mutants de type par ... 19

a) Conjugaison et transduction ... 20
b) Introduction de divers épisomes chez la souche parB (MFT100) ... 21

B/ Mutants de type fts ... 22

a) Conjugaison et transduction ... 23
b) Examen du caractère dominant ou récessif des mutations fts chez les souches mérodiploides ... 29

Chapitre 3

ETUDE PHYSIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE ... 37

Introduction ... 37

A/ Mutants de type fts ... 41

1) Formation de cellules filamenteuses à haute température ... 41
2) Survie à haute température ... 42
3) Synthèses macromoléculaires ... 42
4) Reversibilité de l'inhibition de la division cellulaire, en présence et en absence de synthèses protéiques ... 44
5) Division à 30°, en l'absence de synthèses d'acide désoxyribonucléique des filaments formés à 41° par une souche reversible ... 49
6) Mesure de la variation d'intensité de fluorescence après l'addition d'acide 1-anilino-8-naphtalène sulfonique (ANS) ... 52
7) Sensibilité à l'égard du déoxycholate de sodium ... 53
8) Analyse des protéines membranaires ... 53
9) Effet de la pénicilline sur les mutants de type fts ... 54
10) Enzymes de la paroi cellulaire ... 57
11) Formation des filaments chez les doubles mutants de type fts-rec ... 58
12) Induction de la multiplication du prophage à haute température chez les cellules filamenteuses ... 59

B/ Etude du mutant MFT100 (parB) ... 63

Chapitre 4

MUTANTS REVERSES THERMORESISTANTS ... 67

Introduction ... 67

1) Isolement des mutants ... 68
2) Sensibilité au rayonnement ultraviolet ... 69
3) Examen de l'exonuclease VII ... 70
4) Aspects génétiques ... 71
5) Résistance à l'égard de la mitomycine C ... 72

Chapitre 5

MUTANTS RESISTANTS A LA MITOMYCINE
MUTATION divC. MUTATION divA 75

Introduction

Mutants divC résistants à la mitomycine 76
Discussion 80
Mutation minA 82

Chapitre 6

EFFET DES SELS ET AUTRES COMPOSES SUR L'EXPRESSION
DE DIVERSES MUTATIONS 84

Introduction 84

1) Effet du NaCl sur des mutants de division cellulaire (type fts) 85
2) Effet du NaCl sur des mutants de réplication du DNA 86
3) Effet du NaCl sur des mutants sensibles au rayonnement ultraviolet 87
4) Effet du NaCl sur la sensibilité à la pénicilline 89
5) Effets comparés de divers sels et d'autres composés 90
6) Aspects génétiques 93
7) Mode d'action 94

Chapitre 7

ISOLEMENT DE MUTANTS PRESENTANT DES ALTERATIONS AU
NIVEAU DE LA MEMBRANE CELLULAIRE 98

Introduction 98

I. Matériel et méthodes 100
II. Résultats

A) Isolement des mutants 102
B) Mesure de la perméabilité des cellules à un analogue du lactose 105
C) Sensibilité à l'égard du déoxycholate de sodium 109
D) Variation de la fluorescence après addition d'acide 1-anilino-8-naphtalène sulfonique (ANS) 110

E) Aspects génétiques 110
F) Isolement de mutants sensibles au déoxycholate de sodium 111

Conclusion 112

RESUME, DISCUSSION et CONCLUSION 114

Bibliographie 137

Remerciements 146

TABLEAUX 1a, 1b, 1c et 1d

SOUCHES BACTERIENNES

1a) Mutants de division cellulaire

1b) Dérivés de ces mutants

1c) Souches diverses utilisées au cours de l'étude génétique

1d) Mutants de la membrane cellulaire

MATERIEL ET METHODES

Nous décrirons ici les souches bactériennes et les milieux de culture que nous avons utilisés. On trouvera ensuite la plupart des méthodes qui ont été employées pour étudier ces souches. Seront en revanche décrits dans le texte même du mémoire, quelques protocoles expérimentaux dont la description peut contribuer à la compréhension de l'exposé.

I) Souches bactériennes

Les mutants conditionnels thermosensibles qui forment des cellules filamenteuses à haute température ont été isolés à partir de la souche PA3092 (F^- , thr, leu, trp, his, thyA, argH, thi, $lacy_1$ ΔO1, malA/λ R, mtl, mel, tonA, $supE^+$, str, coll. F. Jacob) dans le cas des séries PAT et MFT, et à partir de la souche CR34 (thr, leu, thyA, thi, $lacy_1\Delta 101$, coll. F. Jacob) dans le cas des mutants de la série CRT.

Les mutants des séries LM (perméables au Lactose et au Maltose) et DE (sensibles au Déoxycholate de sodium) qui présentent des altérations de la membrane ont été obtenus à l'aide de la souche PA505 MB Δ101 MH_1 (his, met,

Tableau 1a

Souche	Mutation conférant la thermosensibilité	Caractères parentaux	Caractères additionnels
MFT1	ftsA	thr, leu, his, trp, thyA, argH, his, lacy$_1$ Δ 101, malA/λr, xyl, mtl, mel, tonA, str, supE	
MFT29	ftsG	"	pyrA
MFT33	ftsA	"	
MFT84	ftsB	"	
MFT96	ftsA	"	
MFT99	ftsE	"	
MFT103	ftsD	"	nadB
MFT108	ftsC	"	
MFT109	ftsA	"	
MFT1111	ftsD	"	
MFT1141	ftsF	"	
MFT1181	ftsE	"	
MFT1182	ftsA	"	pyrA
MFT123	ftsE	"	EMB sensible
PAT84	ftsA	"	
MFT115	fts (leaky)	"	
MFT119	fts (leaky)	"	
CRT115	ftsG	thr, leu, thyA, thi, lacy$_1$ Δ101	his
MFT110	parA	thr, leu, trp, his, thyA, argH, thi, lacy$_1$ Δ101, malA/λ^r, xyl, mtl, mel, tonA, str, supE	
PAT32	parA	"	
MFT100	parB	"	
MFT94	DnaA	"	ilv-metE
MFT1112	DnaB	"	

Tableau 1b

Souche	fts	thr leu	trp	his	thyA	argH	lacy	malA /λr	xyl	mtl	mel	tonA	str	Caractères additionnels
MFT1recA	ftsA	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	recA
MFT29recA	ftsG		-	+	+								-	recA, pyrA$^+$
MFT33recA	ftsA	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	recA
MFT84recA	ftsB		-	+	+								-	recA
MFT96recA	ftsA				+								-	recA
MFT99recA	ftsE				+								-	recA
MFT103recA	ftsD				+				-				-	recA, nad$^+$
MFT108recA	ftsC		-	+	+	-	-	-	-		-		-	recA
MFT109recA	ftsA		-	-	+	-	-						-	recA
MFT1111recA	ftsD				+				-				-	recA
MFT1141recA	ftsF	-		-	+								-	recA
MFT1181recA	ftsF		+	-	+	+	-		+				-	recA
MFT1182recA	ftsA	-	-	-	+	-	-	-	-				-	recA
MFT123recA	ftsE	+	-	-	+	-	+						-	recA
MFT100recA	parB	-	-	-	+	-		-	-	-			-	recA
MFT110recA	parA	-	-	-	+	-							-	recA
MFT94recA	dna				+								-	recA
MFT110recB	parA		+	-	+	-	-						-	recB
PAT84recB	ftsA	-	-	-	+	-	-	-					-	recB
PAT8416	ftsA				+									dap-lysA
MFT11821	ftsA				+									dap-lysA-pyrA
MFT1033	ftsD				+									dap-lysA-nad
MFT1181	ftsE			+	+									dap-lysA
MFT33E1	ftsA				+									end
MFT96E2	ftsA				+									end
MFT100E2	parB				+									end
MFT110E1	parA				+									end
MFT96E2R2					+									end-TR-UVs
MFT100E2R2					+									end-TR-UVs
MFT123E1R1					+									end-TR-UVs

Tableau 1b (suite)

Souche	Caractères parentaux														Caractères additionnels
	fts	thr	leu	trp	his	thyA	argH	lacy	malA λ^r	xyl	mtl	mel	tonA	str	
MFT11leu$^+$	ftsA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFT11181leu$^+$	ftsA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	pyrA
Ace10MT961	ftsA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
C600T841	ftsA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	su$^+$
C600MT331	ftsA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	su$^+$
C600MT11823	ftsA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	su$^-$
MFT841	ftsB	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-		-	
MFT108leu$^+$	ftsC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFT10338	ftsD				-	+	+	-	-	-					
P0P577F103	ftsD +	+	+	+	-	+	+/-	+	+/-	+	+	+		-	recA ftsD sur le F
Souches résistantes à la mitomycine															
MFT1002	parB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	divC
MFT1008	parB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	divC-mitB
MFT1C01,4, 6 et 7	parB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mitD(mit TR-UVs)
MFT1003, 9, 11, 12, 15, 17, 19	parB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mitC(mit TS-UVs)
MFT1005,16, 18	parB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mitE(mit TS-UVr)
MFT103M1 à 11	ftsD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mit (TS)
MFT84M1,2, 4,5,7,9,10, 11,12	ftsB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mit (TS)
MFT84M3,6, et 8	ftsB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mit-TR
PAT84M1,2, 3,4,8 et 10	ftsA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mit-TS
PAT84M5,6, 7	ftsA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mit-TR

Tableau 1c

Souche	Caractères origine	Source	Référence
Hfr	thi^- pyrB ← thr leu	W. Hayes	F. Jacob et E. Wollman, 1961
HfrP4X	met^- T L proB → lac		E. Adelberg et S. Burns, 1960
HfrMT1	ftsA, thi^- lac trp → his	M. Ricard	
HfrAT11 (AB311)	trp his → thy		A. Taylor et E. Adelberg, 1960
HfrKL16	thy → ser gly	B. Low	B. Low et T. Wood, 1965
HfrKL165	$recA^-$ rif^- thy → ser gly	M. Hofnung	M. Hofnung, M. Schwartz et D. Hatfield, 1971
HfrP13	cys^- his^- mtl → rbs ilv	F. Jacob	F. Jacob et E. Wollman, 1961
HfrAT13 (AB313	mtl ← rbs ilv		A. Taylor et E. Adelberg, 1960
HfrP72G	met^- ilv metE → metB	F. Jacob	F. Jacob et E. Wollman, 1961
HfrP10	thr^- leu^- thi^- $malB^-$ argH → malB	F. Jacob	" "
HfrG6 MB 101	his^- $malB^-$/ ^{r} selection argG → thy (sm)	M. Schwartz	D. Hatfield, M. Hofnung et M. Schwartz, 1969
AT13SG	mtl ← rbs ilv	M. Hofnung	
AB1360	F^- $aroD_6$ $argE_3$ his_4 $proA_2$ thi_1 $galK_2$ $lacy_1$	J. Pittard	Pittard et Wallace, 1966
AB1450	F^- ilv arg metB thi xyl mal lac tsx str	E. Adelberg	Pittard, Loutit et Adelberg, 1963

Tableau 1c (suite)

AB3303	F^- $argE_3$ his_4 $pabB_3$ thi-1 str700 $galK_2$ $lacy_1$ tsx29	J. Pittard	Huang et Pittard, 1967
AceF10	F^- aceF	Henning	
AT1243	Hfr met pyrE		
C600	F^- thr leu	R. Appleyard	
C600 s^r	F^- thr leu su^- str		
CGSC4253	F^+ (F126) $pyrD_{34}$ thi- 1 mtl-2 xyl-7 str 8 trp-1 gal_6 recA 1 λr	B. Bachmann	K.B. Low, comm. pers.
CGSC4256	F^+ (F123) " "		
CGSC4258	F^+ (F111) argG-6 $metB_1$ his_1 leu_6 $recA_1$ mtl_2 xyl_7 $malA_1$ gal_6 $lacy_1$ or lacz4 str104 sup48 ? (amber) λ r malB-16 rel-1 ?	B. Bachmann	"
CGSC4266	F^+ (F144) thi1 met E70 trpE38 purE42 proC32 leu-6 recA 1 mtl1 xyl5 ara 14 lacz36 tonA23 str 109	B. Bachmann	"
CGSC4289	F^+ (F140) argG6 metB1 his1 leu6 recA1 mtl2 xyl7 malA1 gal6 lacy1 or lacz4 str104 sup48 ? λ r	B. Bachmann	"
CGSC4301	F^+ (F148) thi1 argE3 his4 proA2 aroD5 recA1 mtl1 ? xyl5 galK2 ? lacy1? tsx-29? sup37 (amber) str8	B. Bachmann	"
GY158	F^- thr leu thi thyA pyr	R. Devoret	
GY173	F^- thr leu thi thyA pyr uvrC504	R. Devoret	
GY174	F^- thr leu thi thyA pyr uvrC 503	R. Devoret	
GY175	F^- " " 505	R. Devoret	
GY2545	F^+ (KLF1) thr leu thi his arg pro recA	R. Devoret	

K2-1t	F^- thr leu his pps arg(HBCE)str	H.L.Kornberg	Brice et Kornberg, 1967
K63	F^- gal3 his1 ald 88 man-1 str	P. Overath	Overath, Paoli et Schairer, 1969
KLF22/KL110	F^+ (F122) leu his thy argG metB lac mal xyl recA	B. Low	B. Low, 1968
KMBL82MPE1	F^- uvrA malB str	M. Schwartz	
MI183e	F^- leu brnP thi metE proC purE trp lysA xyl lacz tonA tsx str	M. Iaccarino	
PA255AzR	F^- thi thr leu his pan lacy 1 gal xyl mal mtl ara tonA λ^r azi	F. Jacob	
PA266 sr	F^- thr leu his ser gly thi ara lacy galb mal xyl mtl λ^r tonA str	F. Jacob	
PA5051	F^- his arg pro met ilv thi lacy 1 galb xyl mtl mal ara str	F. Jacob	
POP213	F^- argH proA purA malA str	M. Hofnung	M. Hofnung, Thèse ès-sciences, 1972, Paris
POP468	F^- argH thyA malB recA str λ^r	M. Hofnung	
POP577	F^- his argE malB recA str	M. Hofnung	
RCB6	F^- argH metA his malB rif str	C. Babinet	Babinet, 1971
W2985	F^- $argG^-$	Y. Hirota	Ishibashi, Sugino et Hirota, 1964
W4573	F^- ara lac gal mal xyl mtl mel str	Y. Hirota	"
W4580	F^+ (F15) met	Y. Hirota	"
PA371	F^- thr leu thi his arg metC lacy galb mal xyl mtl λ^r tonA str	F. Jacob	

Tableau 1c (fin)

Tableau 1d

Mutants de la membrane cellulaire.

Souche parentale :

PA505MB Δ101MH1 : his, met, argH, thi lacyl , malB Δ 101, str

Souches décryptifiées pour le lactose et le maltose :

PA505LM3, PA505LM4, PA505LM9
PA505LM14, PA505LM16, PA505LM17, PA505LM31, PA505LM51,
PA505LM53, PA505LM62, PA505LM71, PA505LM82, PA505LM83,
PA505LM91, PA505LM92, PA505LM101, PA505LM102, PA505LM106,
PA505LM110, PA505LM115

Souches résistantes au déoxycholate :

PA505DE1, PA505DE2, PA505DE3, PA505DE4, PA505DE5, PA505DE6,
PA505DE8, PA505DE12, PA505DE13, PA505DE21, PA505DE52,
PA505DE91, PA505DE92, PA505DE103

Souches lac^+ mal^- :

PA3092L3; PA505L20, PA505L104, PA505L114

Souches lac^- mal^+ :

PA505M6, PA505M8, PA505M10

argh, thi, lacy$_1$Δ 101, str) fournie par M. Hofnung.

Les mutants obtenus ont généralement conservé les caractères d'auxotrophie parentaux, toutefois, quelques uns présentent de nouvelles exigences concernant les facteurs indispensables à leur croissance. C'est ainsi que les souches MFT29 et MFT 1182 requièrent de l'uracile (mutation pyrA), la souche MFT103 de la nicotinamide (mutation nadB) et la souche CRT115 de l'histidine (mutation his) .

La liste des mutants originaux tels qu'ils ont été isolés, est donnée dans les tableaux Ia (série MFT, CRT, PAT) et Id (séries LM et DE) ; la liste de certains de leurs dérivés cités dans ce mémoire dans le tableau Ib, et la liste de toutes les autres souches bactériennes utilisées dans le tableau Ic.

2) Milieux de culture

ML : Milieu L + Thymine : Bactotryptone 10g, Yeast Extract 5g, Thymine 50 mg, NaCl 5g, H_2O jusqu'à 1 litre, pH7,3 ajusté avec NaOH

ML-O : milieu L + Thymine, sans addition de NaCl.

BP : Bouillon Pasteur + Thymine : peptone bactériologique 10g, extrait de viande 5g, NaCl 5 g, H_2O jusqu'à 1 litre, PH7,4 ajusté avec NaOH.

EMB : Bactotryptone IOg, extrait de levure 5g, NaCL 5 g, PO_4HK_2 2g, H_2O jusqu'à 1 litre, PH7,4 ajusté avec NaOH, gelose I5 g, Bleu de méthylène à 83 ‰ = 0,078 ml et éosine à 95 o/oo = 0,422 ml.

M63 : milieu synthétique 63 : KH_2PO_4, 13,6 g, $(NH_4)_1SO_4$, 2 g, $MgSO_4$, $7H_2O$ 0,2 g, $FeSO_4$ $7H_2O$ 0,5 mg, H_2O jusqu'à 1 litre, PH7,4 ajusté avec KOH.

- Milieu contenant de la mitomycine : ML + mitomycine C, on utilise des boites préparées fraîchement et conservées à l'abri de la lumière.

- Milieu contenant du déoxycholate de sodium : ML-O + déoxycholate I% (la concentration réduite en sel prévient la formation de micelles par le déoxycholate de sodium.)

3) Isolement des mutants

a- Mutagenèse - 1

Les souches des séries MFT, PAT et CRT ont été obtenues en traitant leurs souches parentales respectives avec l'agent mutagène N-méthyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (Aldrich.Chem.)

Pour cela, IOml d'une culture en croissance exponentielle -(milieu BP), ayant atteint une concentration cellulaire approximativement égale à $3.IO^8$ cell/ml, sont centrifugés, lavés avec 5ml de tampon M63, centrifugés à nouveau et remis en suspension dans I ml du même tampon.

A cette suspension, est ajouté 0,Iml d'une solution de nitrosoguanidine à 0,4% préparée extemporanément en tampon M63.

Après deux heures d'agitation à 30°, les bactéries traitées sont centrifugées et lavées deux fois avec du tampon M63.

b- Expression et détection des mutations thermosensibles.

Pour permettre l'expression des mutations indépendantes recherchées, la suspension traitée, qui a été maintenue dans des conditions de non-croissance pendant la durée de la mutagenèse, est répartie dans vingt tubes de milieu riche (BP) qui sont agités à 30° durant I5 à 20 h.

A partir de chaque tube, on étale sur des boites de milieu (ML) des échantillons de culture dilués de telle sorte que 100 à 500 colonies apparaissent sur chaque boite après 24 h d'incubation à 30°.

La technique des doubles répliques à l'aide d'un velours permet ensuite d'identifier les colonies thermosensibles , l'une des répliques étant incubée à 30°, l'autre à 41°. Le milieu utilisé est du ML-0 pauvre en NaCl. On évite ainsi de manquer les mutants réparables par les sels (chap.VI).

Les fréquences des colonies thermosensbiles est d'environ I%. Ces colonies sont mises en culture en milieu liquide (BP) et leur thermosensibilité est vérifiée.

En fin de compte, on conserve un mutant pour chaque série de boites issue de l'un des vingt tubes initiaux. Ceci, ajouté au fait que les souches parentales sont réisolées avant chaque expérience de mutagenèse, réduit donc la probabilité d'obtenir des mutations non indépendantes.

Ces souches sont consérvées d'une part à -20° dans une solution de glycérol IO% final et, d'autre part à 40°C après lyophillisation.

b - Mutagenèse II

Les souches des séries LM et DE ont été obtenues en traitant la souche PA505 MB Δ101 - MH_1 par l'éthylméthane sulfonate (EMS). Pour cela, 10 cc d'une culture en croissance exponentielle (à 5,10 cell/ml) sont centrifugés et remis en suspension dans 2,5 ml de tampon phosphaté 0,1M PH7,3. On ajoute ensuite 0,05 ml d'EMS (Eastman) à la suspension qui sera agitée pendant 2 heures à 30°. Après un lavage avec du tampon, la culture est divisée entre plusieurs tubes de milieu riche qui sont cultivés 24 heures à 30°. Des échantillons de chaque tube sont ensuite étalés à la surface de milieux appropriés et l'on conserve finalement un mutant pour chaque culture indépendante.

4) Technique de Piéchaud de coloration sans hydrolyse du noyau des bactéries

Cette technique légèrement modifiée consiste à :

- fixer les cellules au moyen de vapeurs d'acide osmique. Pour cela, quelques gouttes de suspension bactérienne lavée (avec du tampon M 63) sont déposées sur une boite de milieu synthétique qui, lorsque les gouttes se sont absorbées, est retournée pendant IO' sur son couvercle contenant 0,4 cc d'une solution d'acide osmique à I%.
- Transférer par simple contact les cellules de l'agar sur des lames de verre.
- terminer la fixation et laver les préparations en plaçant les lames respectivement 15 et 30 minutes dans l'alcool méthylique, puis dans l'eau.
- colorer les bactéries à l'aide d'un mélange de : 2 cc d'une solution d'éosinate dans l'alcool méthylique (0,3%) 0,1 à 0,3 cc d'une solution de bleu de méthylène dans l'eau (1%) et 17 cc d'eau (non déminéralisée, non distillée). Ce mélange doit être utilisé aussitôt après avoir été réalisé.

La quantité de bleu de méthylène ajoutée, de même que le temps de coloration (5 à 20') varient suivant les souches et l'état de fraîcheur des solutions utilisées. On peut suivre la progression de la coloration en examinant les préparations sous un microscope avec un objectif à im-

mersion. Si la coloration est correcte, le cytoplasme doit apparaître de couleur bleu pâle tandis que les noyaux forment des masses opaques violet foncé. Des lamelles sont alors scellées sur les lames avec de la parafine fondue, et les préparations peuvent être ainsi conservées une ou deux semaines. L'utilisation en photomicrographie d'un filtre Zeiss 465130 améliore le contraste entre le cytoplasme et le milieu extérieur.

5) Observation en microscopie électronique.

La préparation et l'examen au microscope électronique de coupes minces de cellules mutées ont été réalisées suivant la méthode de Ryter et Kellenberger (1958)

Nous sommes reconnaissant à Mme A. Ryter d'avoir effectué ces observations.

6) Marquage bref par la thymidine ^{3}H

Un échantillon (1 ml) d'une culture en phase exponentielle en milieu ML contenant 50 /ml de thymine non radioactive, est prélevé et ajouté à 0,1cc de thymidine ^{3}H, de telle sorte que l'activité finale soit de 30 µc/ml. L'échantillon est agité 4 min. à la température adéquate (30 ou 41°), puis la réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) 10% glacé. Après avoir maintenu l'échantillon dans la glace pendant une heure, la frac-

tion insoluble précipitée par le TCA est filtrée sur filtre millipore (0,25 µ) et lavée avec 30 ml de TCA 5% glacé.

Le filtre est ensuite séché, placé dans une fiole contenant IO ml d'un mélange de -toluène-PPO-POPOP (11-3-0,3 g/1) (Packard Instrument Co.), et sa radioactivité mesurée dans un compteur à scintillation Packard Tricard.

7) Marquage bref par l'Uracile ^{14}C

La procédure est similaire à la précédente, l'Uracile ^{14}C)à 1 µ c/ml final remplaçant la thymidine.

8) Marquage générale par l'acide diamino pimélique dihydrochloride - ^{3}H (DAP)

On utilise des dérivés dap^- - lys^- chez lesquels le DAP est incorporé uniquement dans la paroi cellulaire (voir explications dans le texte, p. 43)

La souche étudiée est tout d'abord cultivée pendant la nuit dans du milieu riche (BP) contenant 4 µ c/ml de DAP ^{3}H radioactif et 40γ /ml de DAP non radioactif. Le matin, la souche est remise en culture à 30° dans le même milieu et lorsqu'elle a atteint la phase de croissance exponentielle, elle est divisée en deux parties, l'une qui sera incubée à 41°, l'autre à 31°. A intervalles réguliers, des échantillons de I ml sont prélevés et ajoutés à la même de quantité TCA 10% froid. Ces échantillons sont ensuite

traités et comptés de la même manière que précédemment (6).

9) La préparation du DNA- ^{3}H extrait du phage T7 a été effectuée suivant la méthode de Thomas et Abelson (1965), l'examen des activités enzymatiques de l'endonucléase I et de l'exonucléase VII a été réalisé suivant les procédures décrites par Wright (1971) et Wright et Col. (1971).

10) Mesure de la variation d'intensité de fluorescence après addition d'acide I-anilino-8-naphtalène sulfonique (ANS)

Les échantillons des cultures étudiés sont centrifugés, lavés deux fois avec du tampon phosphate 0,05N PH7 et remis en suspension dans le même tampon. La densité optique des suspensions est ajusté à la valeur 0,5 lue à 350 m µ de longueur d'onde dans des cuves de 0,5 cm de trajet optique (spectrophotomètre Zeiss PMQ11).

Les intensités de fluorescence sont ensuite mesurées avec l'appareil P.F.I. de Monnerie et Neel.

La variation N de l'intensité de fluorescence après addition d'ANS est calculée d'après la formule N = (b-bo) f - (a-ao), dans laquelle interviennent les intensités de fluorescence de la culture (bo), de la culture additionnée d'ANS 0,05N (b), du tampon seul (ao), et du tampon additionné d'ANS 0,05N (b).

Le facteur f qui dépend de la densité optique de la suspension à 350 mμ est ici égal à 3,5 (M. Kasai, comm. pers.)

Pratiquement, on mesure l'intensité de fluorescence d'un échantillon (I ml); puis l'on ajoute la quantité nécessaire d'ANS (0,05N final) dans la cuvette du spectrophotomètre à l'aide d'une pipette "microcap" et après avoir agité la suspension, on lit la nouvelle valeur de l'intensité de fluorescence.

11) Sensibilité au rayonnement ultra-violet

La sensibilité aux rayons U.V. peut être tout d'abord examinée par un test simple sur boîte ; pour cela, des suspensions bactériennes sont étalées à la surface de boites de milieu complet ML suivant des lignes parallèles. Les échantillons reçoivent ensuite des doses croissantes de rayonnement U.V. au fur et à mesure du mouvement d'un cache dont le rebord est perpendiculaire aux alignements bactériens. Les boites sont ensuite incubées 24 heures à 30° ou à 41° et l'on peut alors clairement distinguer les souches sensibles des souches résistantes d'après la position à partir de laquelle aucune croissance n'est observée.

La mesure quantitative de la sensibilité au rayonnement U.V. est réalisée de la manière suivante : les cellules en croissance exponentielle en milieu complet ML sont centrifugées et remises en suspension en milieu

synthétique M63 froid, à une concentration cellulaire d'environ $5,10^6$ cell./ml.

La suspension, en couche liquide mince dans une boite de Pétri, est ensuite soumise à un rayonnement ultraviolet d'énergie approximativement égale à 20 ergs/mm2/sec. Finalement, les échantillons irradiés sont dilués et étalés à la surface de boites de milieu ML. Après 24 à 36 h. d'incubation à la température convenable, on compte le nombre des colonies formées sur ces boites.

12) Dénombrements cellulaires à l'aide d'un compteur de type "Coulter"

Des échantillons de culture dont la concentration cellulaire est comprise entre 6.10^6 et 10^8 cell./ml sont prélevés et dilués 200 fois (0,1m/20 Ml) dans un milieu tampon (M63 + Formol 1 o/oo)préalablement filtré à trois reprises sur filtre millipore 0,25 µ . C'est avec cette suspension diluée que sera effectué le comptage.

Le réglage utilisé avec le Coulter Counter modèle F est A = 0,5 ; O = 4 ; S = 7.

En changeant la valeur de S, il est possible de connaître la distribution des cellules en fonction de la taille.

13) Conjugaison

Les souches en croissance exponentielle (à 30°, en milieu complet BP) sont mélangées dans la proportion de I cellule Hfr pour IO cellules F , la concentration cellulaire étant de 2 à 5, 10^8 cell./ml.

Les mélanges de conjugaison sont laissés de une à quatre heures à 30° sans agitation, puis centrifugés et lavés avec du milieu M63.

Des échantillons convenablement dilués sont ensuite étalés à la surface de boites de milieux sélectifs appropriés.

Après 36 à 48 h. d'incubation, les clones recombinants forment des colonies. Ces clones sont réisolés sur milieu non sélectif, puis ensemencés à raison de 40 par boite sur milieu sélectif.

Leur constitution génétique est finalement analysée en effectuant, à l'aide d'un velours, des répliques multiples sur divers milieux sélectifs (à 30° ou à 41°)

Les croisements $F^+ \times F$ sont réalisés de façon similaire, toutefois, les mérozygotes obtenus sont réisolés sur milieu sélectif afin de maintenir une pression sélective en faveur des cellules qui conservent l'épisome introduit au cours du croisement.

14) Transduction par le Phage P_1

Le lysat par le phage P_1 de la souche porteuse de l'allèle génétique que l'on souhaite transduire est obtenu selon la méthode décrite par C.Babinet (Thèse es-sc Paris). La transduction elle-même est réalisée de la façon suivante : la souche réceptrice est cultivée en milieu riche (BP) additionné de chlorure de calcium ($5x10^{-3}M$). Lorsque le titre de la culture atteint 5.10^8 cellules/ml, un lysat de phage P_1 est ajouté à 3 ml de la souche réceptrice, la multiplicité d'infection étant de 0,5 à 1 (on aura pris la précaution de chasser soigneusement le chloroforme dissous dans le lysat du phage en y faisant circuler des bulles d'air à l'aide d'une pipette).

Après avoir laissé le mélange 15' à la température ambiante sans agitation, du citrate de sodium (1% final) est ajouté afin de complexer les ions Ca^{++} et de prévenir ainsi l'absorption ultérieure de particules phagiques sur les bactéries. Après que la suspension ait été centrifugée et lavée deux fois avec du milieu 63 (+ 0,3% final de citrate de sodium), des échantillons sont finalement ajoutés à 3 ml de gelose 6 o/oo fondue et étalés en surcouche à la surface de boites de milieux sélectifs contenant du citrate de sodium (0,3% final). A titre de contrôle, le même protocole est appliqué à la souche réceptrice en l'absence de phage P_1.

CHAPITRE I

ISOLEMENT DE MUTANTS INCAPABLES DE SE DIVISER.

Mutants thermosensibles

Afin d'étudier le processus de la division cellulaire, nous avons entrepris d'isoler une collection de mutants conditionnels thermosensibles qui cessent de se diviser à haute température, tout en continuant à croître. Les raisons de ce choix ont été exposées au cours de l'introduction. On recherchera donc des souches dont les cellules, normales à 30°, forment des filaments à 41°.

Parmi 80 mutants thermosensibles indépendants isolés sur milieu complet par la technique des doubles répliques (cf. Matériel et Méthodes), 24 forment des

cellules filamenteuses lorsqu'ils sont cultivés à 41°. Plusieurs types d'altérations peuvent à priori exister chez des mutants de ce type : altérations de la synthèse du DNA, de la répartition des chromosomes et de la formation du septum. On peut donc effectuer un premier tri parmi ces mutants divers en examinant la morphologie et la disposition des noyaux dans les cellules filamenteuses.

Coloration nucléaire.

Nous avons utilisé dans ce but la technique de coloration nucléaire de Piéchaud (1954) (cf.Matériel et Méthodes). Les résultats de ces expériences qui sont représentés dans les planches A, B, C, D, E,et F, nous ont conduit à distinguer trois catégories de mutants :

1) Des mutants de DNA, caractère noté dna, chez lesquels on n'observe qu'un seul ou deux noyaux au centre du filament. (On suppose donc que, chez ces mutants, la synthèse du DNA s'arrête à 41° dans l'intervalle d'un temps de génération). Deux mutants de ce type ont été obtenus.

2) Des mutants dits de partition, caractère noté par, chez lesquels on observe une importante masse nucléaire dans la zone centrale du filament (la synthèse du DNA et l'élongation cellulaire se poursuivent, mais la séparation et la répartition des copies est inhibée). Nous avons obtenu deux mutants de ce type.

3) Des mutants dits de septation, caractère noté fts, chez lesquels on observe de nombreux noyaux répartis sur toute la longueur du filament (les deux fonctions précitées s'expriment normalement, mais aucun septum n'est formé). Nous avons obtenu vingt mutants de ce type.

La liste nominative des mutants appartenant à chacune de ces catégories est donnée dans les légendes qui accompagnent les planches A à F. Quelques caractéristiques supplémentaires y sont également décrites.

Microscopie électronique.

L'arrêt de la division cellulaire peut résulter soit de l'absence complète de septum intercellulaire, soit de la présence de structures incomplètes ou anormales. L'exa-½ men de la morphologie des mutants a donc été poursuivi par l'observation en microscopie électronique de coupes fines des cellules filamenteuses. Un mutant de chacun des types génétiques identifiés au chapitre 2 (fts A à G, par A et B, dna A et B) a été examiné de cette façon.

Ces observations (dues à Mme A.Ryter) ont permis de vérifier l'absence complète de septum chez les filaments formés à haute température par les mutants étudiés. En aucun cas, on ne trouve d'ébauches de septum ou d'anomalies dans la structure de la paroi et de la membrane cellulaire.

En résumé, nous avons isolé 24 mutants qui forment des filaments dépourvus de septum à haute température. Parmi ceux-ci, il a été trouvé 20 mutants de type fts, 2 mutants de type par et 2 mutants de type dna.

Notre propos étant d'étudier les dernières étapes du processus qui permet à une cellule de se diviser, à savoir la formation du septum et le clivage de la cellule, ce seront donc les mutants de type fts qui constitueront notre principal matériel d'étude. En effet, chez ces mutants, l'arrêt de la division n'est pas un effet secondaire de l'arrêt de la duplication ou de la répartition des chromosomes : c'est donc par leur étude que l'on peut espérer identifier les fonctions qui sont directement responsables de la formation du septum.

LEGENDES DES PLANCHES

Ces planches représentent le résultat des expériences de coloration nucléaire par la technique de Piéchaud et des observations au microscope électronique par la technique de Ryter et Kellenberger.

Pour plus de commodité, nous avons également regroupé les mutants suivant leur nature génétique, anticipant ainsi sur les résultats qui seront présentés au chapitre 2.

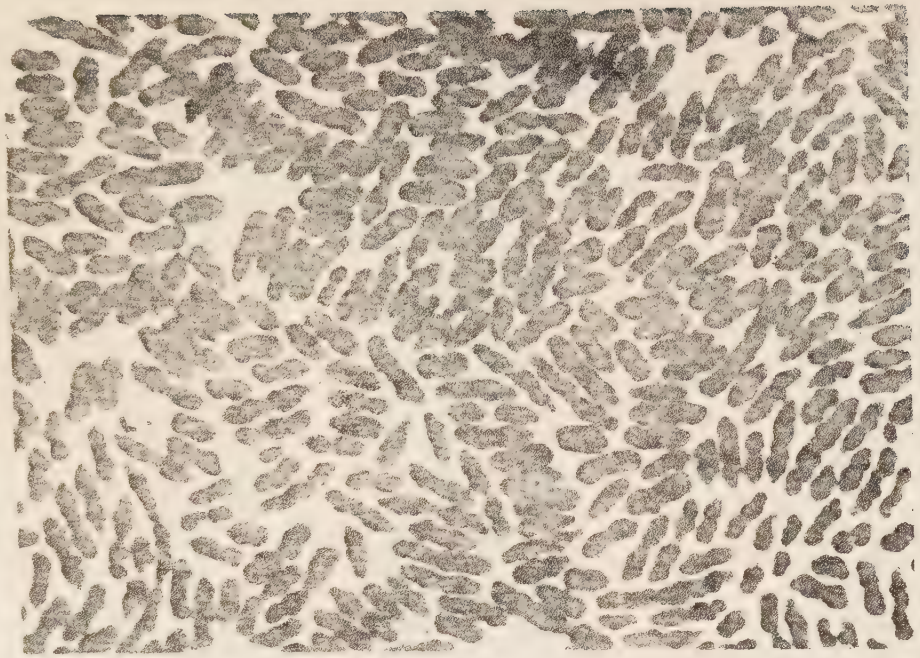
Nous avons choisi une illustration représentative pour chaque type morphologique observé.

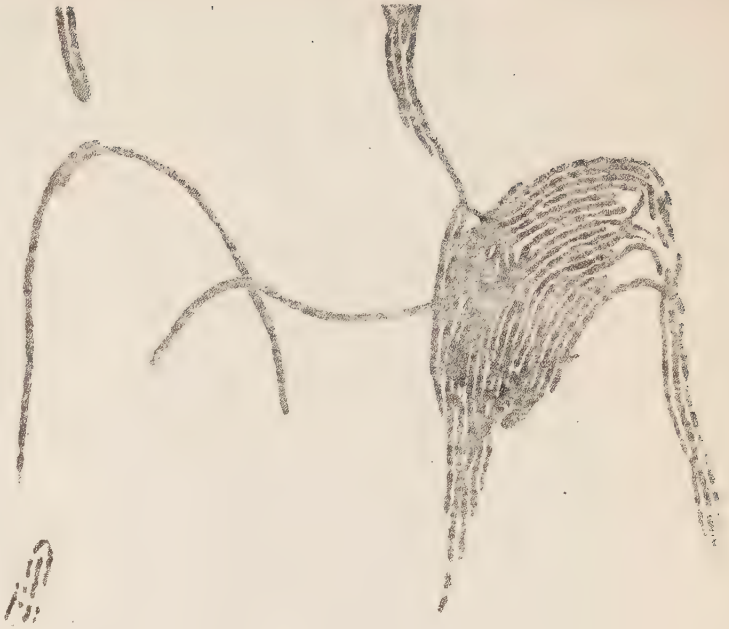
Planche A — PA3092 et CR34

Les souches parentales thermorésistantes se présentent à 30° comme à 41° sous la forme de cellules de taille normale (2 µ de long environ), possédant généralement 1 ou 2 noyaux. La plupart des mutants thermosensibles ont également cet aspect lorsqu'ils sont cultivés à 30°.

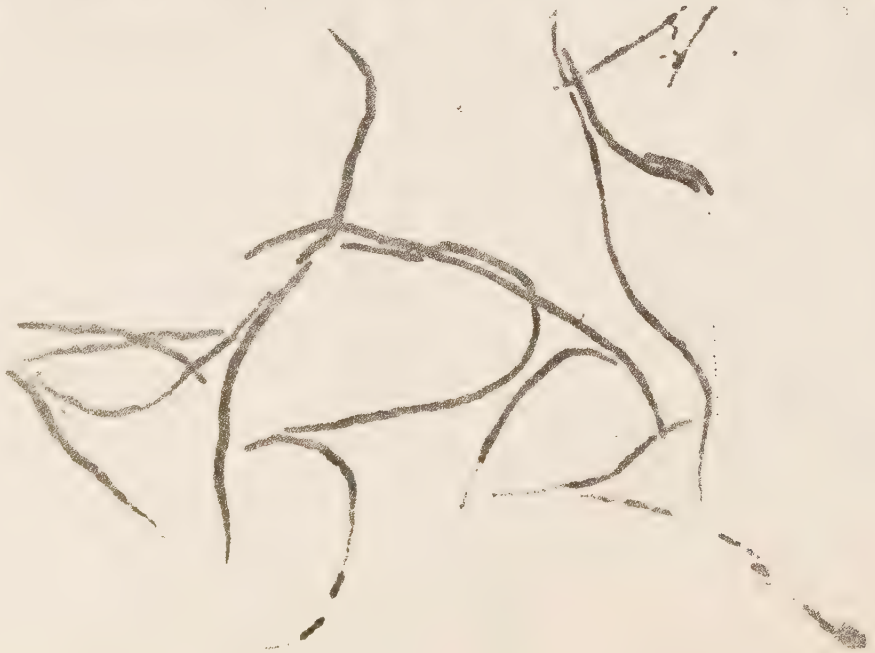
Planche B — Mutants de type fts (A, D, E, F et G) (p. 41). Ici MFT1182 après deux heures de croissance à 41° en ML + thymine. L'élongation cellulaire, la multiplication et la répartition des noyaux se poursuivent en l'absence de toute division cellulaire. Les mutants suivants ont une morphologie similaire :

ftsA : MFT1, MFT33, MFT96, MFT109, MFT1182, PAT84 -
ftsD : MFT103, MFT1111 - ftsE : MFT99, MFT1181, MFT123 -
ftsF : MFT1141 - ftsG : MFT29, CRT115 -
fts (non localisé) : MFT2, MFT115, MFT119.





A B
C D



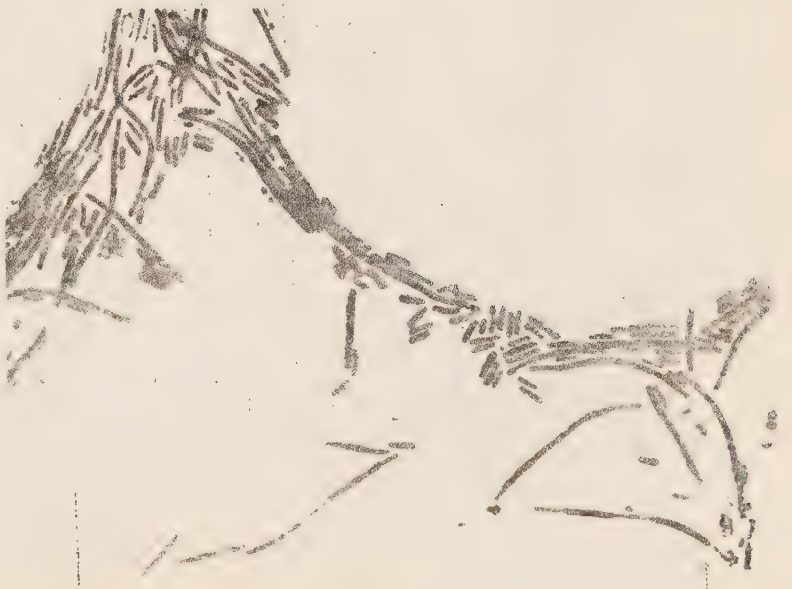


Planche C — Mutants de type fts (B et C) (p. 41). Ici MFT84 après deux heures de croissance à 41° en ML-O. Tandis que l'élongation cellulaire et la synthèse du DNA se poursuivent, une perturbation partielle de la répartition des noyaux s'ajoute à l'altération de la division cellulaire. Ceci conduit à la formation de filaments possédants plusieurs groupes nucléaires. Occasionnellement, quelques divisions cellulaires peuvent se produire aux extrémités des filaments conduisant à la formation de bactéries dépourvues de DNA. Les mutants de ce type sont :

ftsB : MFT84 - ftsC : MFT108

Planche D — Mutants de type parA (p. 19). PAT32, après deux heures de croissance à 41° en ML. Des filaments de taille moyenne sont formés, le DNA est synthétisé mais les copies successives demeurent au centre du filament constituant une importante masse nucléaire. L'expression d'une mutation secondaire de type div (p. 75) permet la formation du septum aux extrémités des cellules qui ségrégent ainsi des bactéries sans DNA. Deux mutants de ce type sont connus :

PAT32 et MFT110

Planche E — Mutant de type parB (p. 20) : MFT100 après deux heures de croissance à 41° en ML, des filaments de grande taille sont formés, le DNA est synthétisé, mais la séparation et la répartition des noyaux est altérée. Un seul mutant de ce type est connu.

Planche F Mutants de type dna. La synthèse du DNA étant altérée, on ne trouve qu'un ou deux noyaux situés au centre du filament. L'élongation cellulaire se poursuit et en l'absence de la mutation div, la division cellulaire s'arrête après un certain délai. De nombreux mutants dna (A à G) sont connus (ici un mutant dnaB - PA505 T 421 construit pour étudier l'effet de la mutation div, p.79). Les souches MFT94 (dnaA) et MFT1112 (dnaB) appartiennent également à cette catégorie.

Planche G Examen par la technique de Ryter et Kellenberger (1958) d'une coupe du mutant MFT103. Les vacuoles nucléaires sont également distribuées tout au long du filament et aucune ébauche de septum ne peut être observée.
Gr. 39.600 x

G

E

F

CHAPITRE II

ETUDE GENETIQUE

L'examen morphologique des mutants qui forment des filaments à haute température a donc permis de distinguer sommairement plusieurs catégories phénotypiques (*fts*, *par* et *dna*).

Toutefois, seule l'analyse génétique peut permettre de confirmer et de préciser cette distinction, en identifiant les gènes mutés et les mutants qui s'y rapportent.

L'analyse présentée ci-dessous comporte la localisation génétique des mutations étudiées sur la carte chromosomique d'*E.coli* (Taylor, 1970) et l'examen de leur caractère dominant ou récessif par rapport à l'allèle sauvage correspondant.

La localisation génétique de ces mutants a tout d'abord été déterminée par des expériences de conjugaison puis précisée par des expériences de transduction avec le phage PI.

La construction de souches mérodiploïdes portant tout à la fois un allèle muté et l'allèle sauvage correspondant ont permis ensuite de définir le caractère, dominant ou récessif, de ces mutations.

Nous envisagerons tout d'abord l'étude de trois mutants de type par, puis détaillerons l'ensemble des résultats obtenus avec les mutants de type fts.

Quant aux mutants de type dna, leur caractérisation sortant quelque peu des limites que nous avons fixées à notre étude, nous nous contenterons de signaler que la mutation du mutant MFT94 est cotransductible par le phage P1 avec le gène ilv (17% de cotransduction), localisation qui correspond à celle du locus dnaA (Hirota, Mordoh et Jacob, 1970). Quant à la mutation du mutant MFT1112, elle est située à proximité du gène argH et donc du locus dnaB (Hirota, Ryter, et Jacob, 1968).

A/ Mutants de type par.

Nous avons vu que chez les mutants de type par (planches D et E) les noyaux étaient synthétisés, mais ne

pouvaient être séparés et répartis. Il est intéressant de noter que cette altération a également pour effet secondaire d'arrêter la division cellulaire et d'entraîner la formation de cellules filamenteuses. Tout comme la réplication des chromosomes (voir l'Introduction) leur répartition est donc nécessaire à l'expression des dernières étapes du cycle de la division. Deux souches de type par (MFTIIO et MFT1OO) ont été trouvées parmi les mutants nouvellement isolés. Elles présentent quelques différences morphologiques (voir planches D et E), notamment en ce qui concerne la taille des cellules filamenteuses formées à haute température. L'une d'entre elles, MFT11O, a un aspect similaire à celui de la souche PAT32 décrite précédemment (Hirota, Ryter et Jacob, I968). L'analyse génétique confirme l'existence de deux locus distincts parA et parB (Hirota, Ricard et Shapiro, I971).

a) Conjugaison et transduction.

parA :

L'usage de diverses couches Hfr et l'analyse de la composition génétique des clones recombinants obtenus indiquent que les mutations de type parA sont localisées entre les locus malB et pil (Tableau 15

Il a été trouvé, par ailleurs, que les gènes parA et

TABLEAU 2

Analyse des croisements réalisés avec les souches PAT32 et MFT110, toutes deux de type parA.

1 représente un caractère hérité de Hfr et

0 le caractère original de la souche F^-

-o-o-o-o-

Tableau 2

ParA

Nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants							Nombre de colonies analysées	Constitution génétique des recombinants			
		argH	parA	thr leu	lac	trp	his	thy		argH	parA	thr leu	nombre
HfrP13(TR) x PAT32 (parA)	thr leu	45	63	100	29	-	-	-	79	1	1	1	30
										0	1	1	19
										1	0	1	5
										0	0	1	24
HfrP72G(TR) xPAT32 (parA)	thr leu	17	33	100	15	1	0	0	59				
HfrH(TR) x PAT32(parA)	lac	0	0	57	100	3	-	-	30				
HfrP10(TR)x PAT32(parA)	argH	100	0	0	-	-	-	-	40				
HfrP13(TR)x MFT 110 (parA)	thr leu	-	20	-	-	-	-	-	100				
HfrP72G(TR)x MFT 110 (parA)	thr leu	-	21	-	-	-	-	-	100				
HfrH(TR) x MFT 110 (parA)	thr leu	-	0	100	22	-	-	-					
HfrP10(TR) xMFT 110 (parA)	argH	100	0	-	-	-	-	-					

TABLEAU 3

Analyse des croisements réalisés avec la souche MFT110 de type parB.

1 représente un caractère hérité de Hfr et

0 le caractère original de la souche F^-

-o-o-o-o-o-

Tableau 3

ParB

Nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants							Nombre de colonies analysées	Constitution génétique des recombinants				
		thr leu	lac	trp	his	thyA	parB	arg		str	parB	thyA	his	nombre
Hfr(TR) x MFT100 (parB)	thr leu	100	33	-	-	-	0	0	100					
	his	-	-	56	100	12	9	0	105	0	1	1	1	5
										0	0	1	1	10
										0	1	0	1	5
										0	0	0	1	85
HfrP10(TR) x MFT100 (parB)	his	-	-	-	100	17	25	12	82					

TABLEAU 4

Expériences de transduction par le phage P_1

Locus parA et parB

-•-o-o-o-o-

Tableau 4

parA et parB

Souche donatrice	Souche réceptrice	Sélection	Fréquence de cotransduction entre le caractère sélectionné et le caractère par	
			nombre	%
MFT110 (parA, purA$^+$)	POP213 (parA$^+$, purA$^-$)	parA$^+$	49TS/130	38
MFT100 (parB, argG$^+$, metc$^+$, ser.gly$^+$)	W2985 (parB$^+$, argG$^-$)	argG$^+$	0TS/36	-
"	PA371 (parB$^+$, metc$^-$)	metc$^+$	0TS/15	-
"	PA260sr (parB$^+$, ser gly$^-$)	ser.gl	0TS/50	-

purA étaient cotransductibles par le phage P1 avec une fréquence de 40% (tableau 4 et fig.I).

parB :

Les données concernant la souche MFT100 indiquent que le locus parB est situé entre les locus str et thyA (Tableau I3). Aucune cotransduction n'a été observée entre le gène parB et les gènes argG, metC et ser-gly (tableau 14)

La localisation du locus parB va être précisée ci-dessous :

b) Introduction de divers épisomes chez la souche parB (MFT100)

L'usage d'épisomes de tailles diverses a permis de localiser le locus parB avec plus de précision.

La construction de souches diploïdes $parB^+/parB^-$ a également montré que la mutation parB était récessive par rapport à l'allèle sauvage. Ceci est notamment prouvé (Tableau 15) par le fait que les souches MFT100-recA, qui portent l'épisome F122 reçu de la souche KL110 sont thermorésistantes.

Si l'on cultive ces clones mérozygotes en milieu riche, on observe l'apparition de clones F^- thermosensibles qui forment des filaments à 41° à la suite de la perte de l'épisome.

TABLEAU 5

Résultats des croisements de la souche MFT100 (parB) avec diverses souches portant des épisomes

-o-o-o-o-o-

Tableau 5

parB

Nature du croisement	Sélection	Caractère $parB^+$ (thermorésistance)	Possibilité de retransmettre l'épisome à une autre souche
KL110(F122) x MFT100	$thyA^+$ (30°)	41TR/76 thy^+	
KL110(F122) x MFT100	$thyA^+$ $parA^+$ (41°)	47/47	23/47 retransmettent le caractère $argG^+$ à la souche W2985
KL110(F122) x MFT100 recA	$parA^+$ (41°)	60/60	
W4580(F'15) x MFT100	$thyA^+$ (30°)	0TR/34 $thyA^+$	
CGSC4289(F140)	$malA^+$ (30°)	0TR/40 $malA^+$	tous retransmettent le caractère $argG^+$ à la souche W2985

Le tableau 5 montre en revanche que les épisomes F140 et F15 ne portent pas l'allèle sauvage du gène parB.

Compte tenu des dimensions de ces épisomes et des gènes qu'ils portent, on peut localiser le locus parB comme suit :

En conclusion cette étude a donc permis la caractérisation d'un nouveau locus de type par (parB) ainsi que la localisation précise à l'aide d'expériences de transduction du locus parA déjà connu.

B. Mutants de type fts.

L'analyse génétique de 16 mutants qui forment des filaments multinucléés a révélé, parmi eux, l'existence de 7 locus génétiques.

Deux d'entre eux étaient déjà connus (Van de Putte, Van Dillewijn et Rörsh, 1964 ; Hirota, Ryter et Jacob, 1968 ; Wijsman, 1970), à savoir ftsA qui avait été localisé entre les locus leu et azi, et ftsB entre les locus

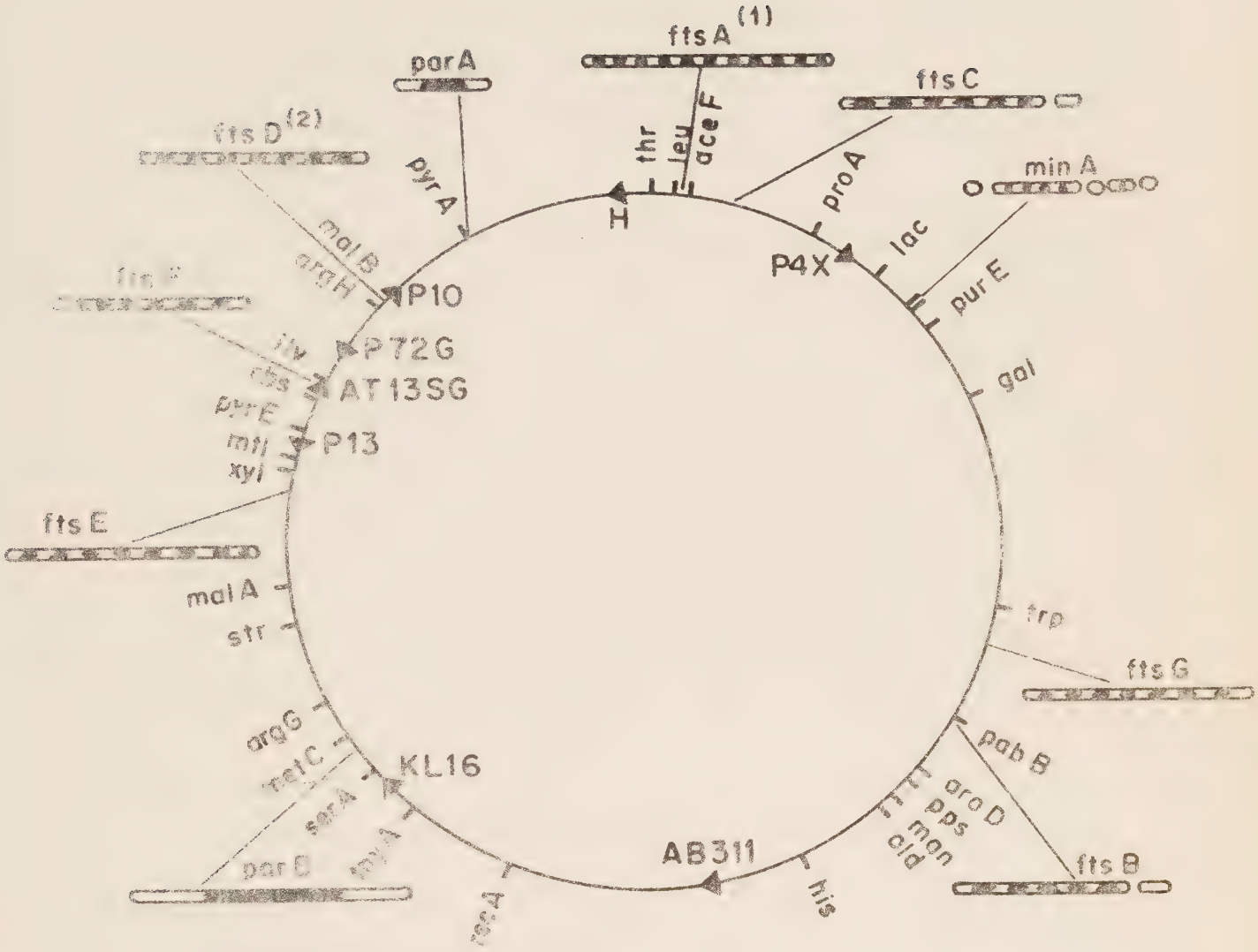
pyrf et his (voir la fig. 1 et la carte chromosomique d'E. coli, Taylor, 1970). Leur situation a été ici précisée. Cinq autres locus (fts C à G) ont été nouvellement identifiés et leurs positions sont également représentées sur la fig. 1.

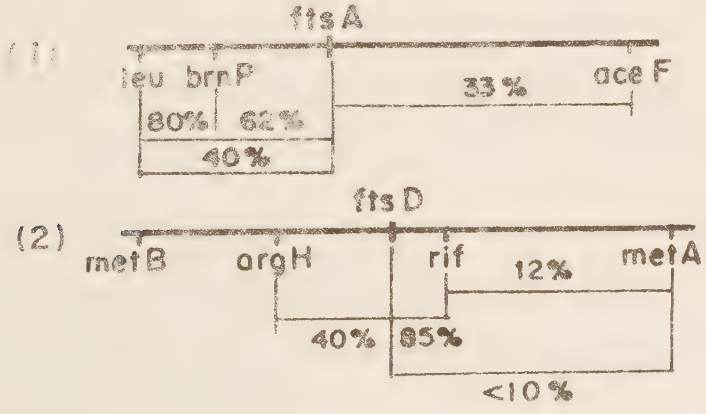
a) Conjugaison et transduction

La plupart des expériences de conjugaison ont été réalisées en croisant les souches fts (F^-) avec diverses souches Hfr thermorésistantes. Dans certains cas, les croisements réciproques (Hfr fts x F^- TR) ont également été effectués. Des clones recombinants ont été sélectionnés pour leur faculté de croître soit en l'absence de certains facteurs, soit à haute température, puis leur constitution génétique a été examinée (cf Matériel et Méthodes), cet examen permet de localiser les mutations étudiées par rapport à d'autres mutations déjà connues.

Lorsque l'on considère l'ordre des gènes qui sont transférés par la souche Hfr à la souche F^-, on observe toujours que la fréquence de recombinaison des gènes situés en position distale par rapport à l'allèle sélectionné décroît très rapidement (de façon exponentielle) en fonction de la distance à cet allèle. Le gradient ainsi observé donne généralement une idée assez claire

Fig. 1. Localisation des gènes fts, par et min sur la carte chromosomique d'E.Coli. Sur les graphiques (1) et (2) les chiffres représentent les fréquences de cotransduction par le phage P_1.
Nous avons également représenté les origines des souches Hfr utilisées dans notre étude génétique.


ftsA (1)
parA
ftsC
ftsD (2)
pyrA
thr
leu
aceF
minA
malB
argH
proA
lac
P4X
purE
P10
P72G
AT13SG
P13
gal
pyrE
mtl
xyl
ftsE
malA
str
trp
ftsG
argG
trpC
KL16
pabB
serA
araD
pps
man
cld
AB311
his
ftsB
parB
ftsA


(1)
ftsA
leu
brnP
aceF
33%
80%
62%
40%
(2)
ftsD
metB
argH
rif
12%
metA
40%
85%
<10%

des positions relatives des marqueurs distaux. L'analyse de la composition génétique des recombinants permet généralement de préciser ces positions.

Les résultats de ces expériences figurent dans les tableaux 6 à 11.

Les expériences de transduction par le phage PI, dont le protocole a été décrit dans la section "Matériel et Méthodes" font intervenir les marqueurs génétiques situés à proximité immédiate de la mutation étudiée. Les résultats de ces expériences ont été rassemblés dans les tableaux 12 à 18.

Nous avons classé les données présentées ci-dessous en fonction des conclusions qui peuvent en être tirées.

1) FtsA :

Les mutations des souches MFT1, MFT33, MFT96, MFT109, MFT1182 et PAT84 présentent une fréquence de liaison élevée avec les locus thr et leu (86% en moyenne). Lorsque l'on considère l'ordre des gènes thr - leu fts et lac, l'examen de la composition génétique des recombinants indique que fts est situé entre thr-leu et lac (tableau 6).

Les expériences décrites dans le tableau 8 montrent que les mutations fts des souches précitées sont cotrans-

ductibles par le phage P1 avec le locus leu (40%). Le lotus ftsA est en outre cotransductible avec le locus brnP (62%) et aceF (33%)

Lorsque des souches donatrices ftsA$^-$, leu$^+$, brnP$^+$, et ftsA$^-$, leu, aceF$^+$ sont utilisées pour transduire respectivement les allèles leu$^+$ et aceF$^+$ chez des souches réceptrices de génotype ftsA$^+$, leu$^-$, brnP$^-$ et ftsA$^+$, leu$^+$, aceF$^-$, l'examen de la composition génétique des clones transduits (tests "trois points" montre sans ambiguité que l'ordre des gènes dans cette région du chromosome est : thr-leu-brnP-ftsA-aceF. Les distances relatives de ces gènes, ainsi que nous avons pu les évaluer, ont été représentées sur la fig. I (1).

2) FtsB et ftsG :

L'examen du tableau 7 montre que les mutations fts des souches MFT84, MFT29 et CRT115 sont situées entre les gènes trp et his.

Les expériences de transduction décrites dans les tableaux 13 et 18 permettent de distinguer deux locus dont l'un, ftsB (MFT84), est cotransductible avec le locus pabB et l'autre, ftsG (MFT29, CRT115) ne l'est pas (fig.1)

Aucune de ces mutations n'est cotransductible avec les locus pyrF, aroD, pps, man et old (tableaux 13 et 18)

Les expériences décrites plus loin concernant des souches mérozygotes (p. 35) confirment la distinction entre les locus ftsB et G et précisent la localisation du locus ftsG qui se trouve situé entre les gènes trp et pabB.

Il est intéressant de noter que la morphologie particulière du mutant MFT84 (filaments avec plusieurs groupes de noyaux, cf. planche C) est également observée chez la souche AB3303-MT84 qui a reçu la mutation ftsB par transduction.

3)ftsC (souche MFTI08) :

L'allèle sauvage de la mutation fts du mutant MFTI08 figure parmi les premiers gènes transférés par les souches HfrH et HfrP4x8 (fig.1 et tableau 8). L'examen de la composition génétique des clones recombinants issus de ces croisements indique que cette mutation est située entre les locus thr-leu et lac, comme c'est également le cas des mutations ftsA.

En revanche, à la différence des mutations ftsA, la mutation du mutant MFT108 n'est pas cotransductible avec les gènes leu et aceF, et elle ne l'est pas par ailleurs avec les gènes thr et proA.

Le locus correspondant a donc été dénommé ftsC et localisé entre les locus aceF et proA.

4) ftsD :

Les résultats des expériences de croisements qui font intervenir les souches MFT103 et MFT 1111 mettent en évidence la liaison existant entre leurs mutations fts et le locus argH (tableau 9).

Toutefois, la position relative de ces mutations par rapport à d'autres gènes de cette région du chromosome n'a pu être précisée qu'à l'aide des expériences de transduction.

Le tableau 6 montre en effet que ces mutations fts et le gène argH sont cotransductibles avec une fréquence assez élevée (20 - 40 %). Une analyse plus détaillée conduite avec la mutation fts de la souche MFT103 a permis de situer ce locus, nommé ftsD, entre les locus argH et rif, à proximité de ce dernier ; fig.1 (2).

5) FtsE :

Le tableau 10 permet de voir que les mutations fts des souches MFT1181, MFT123 et MFT99 sont liées avec le locus xyl.

En effet, lorsque ces mutants sont croisés avec la souche HfrH, le caractère thermorésistant n'apparaît pas lorsqu'on sélectionne des recombinants pour la région du chromosome qui va de thr-leu à thyA. En revanche; on trouve un grand nombre de clones thermorésistants parmi

les recombinants argH$^+$ et on observe alors que les caractères fts et xyl sont fortement liés.

On constate par ailleurs que le caractère thermorésistant figure parmi les premiers gènes transférés à une souche F par la souche Hfr AT13SG et non pas par la souche HfrP13.

Les mutations fts étudiées sont donc situées entre les gènes ilv et malA.

Dans le cas du mutant MFT1181, l'analyse des clones recombinants obtenus lors des croisements avec les souches HfrAT13SG et HfrG6 indiquent que la mutation fts correspondante nommée ftsE est située plus précisément entre les gènes xyl et malA.

En revanche, les croisements du mutant MFT99 avec les souches HfrAT13SG et HfrH (sel argH$^+$) suggèrent que la mutation thermosensible correspondante serait localisée entre les locus ilv et xyl et montrent qu'elle est fortement liée au locus mtl.

Les expériences de transduction avec le phage P1 n'ont pas permis de préciser davantage cette localisation. Aucune cotransduction, en effet, n'a été observée entre les mutations fts des souches MFT1181 , MFT99, MFT123 et les divers gènes examinés dans cette région du chromosome, à savoir malA, xyl, pyrE, ilv et argH (tableau I6)

6) ftsF :

Dans le cas de la mutation ftsF (souche MFT1141), une localisation précise (entre les positions 72 et 74 min.de la carte chromosomique d'E.coli a été obtenue grâce aux expériences de croisements (tableau 11). Les croisements avec les souches HfrH et AT13SG montrent, comme ce fut le cas pour les souches précédentes (ftsE), que cette mutation est située à proximité du gène xyl . En revanche, à la différence des allèles ftsE l'allèle sauvage du gène ftsF fait partie des premiers marqueurs génétiques transmis non seulement par la souche HfrAT13SG, mais également par la souche HfrP13. Les marqueurs dits "précoces" communs à ces deux Hfr étant en nombre extrêmement limité, les possibilités de localisation du gène ftsF se trouvent par là-même restreintes à un court segment du chromosome (fig.1).

Le tableau 17 montre par ailleurs que les locus ftsF et ilv sont cotransductibles avec une fréquence de 40%.

L'ensemble de ces résultats permet donc de dire que le locus ftsF se trouve situé à proximité du locus ilv, du côté de pyrE.

b) Examen du caractère dominant ou récessif des mutations fts chez des souches mérodiploïdes.

Pour déterminer si une mutation fts est dominante ou récessive par rapport à l'allèle sauvage, on introduit chez

LEGENDES DES TABLEAUX 6 à 11

La constitution génétique des recombinants (qui a été examinée dans tous les cas) n'est donnée ici que lorsqu'elle permet de localiser clairement la mutation considérée. Les deux marqueurs extérieurs les plus proches sont alors seuls représentés. Les caractères qui proviennent du mâle Hfr sont symbolisés par le signe 1, tandis que ceux qui n'ont pas été l'objet d'une recombinaison génétique, sont représentés par le signe 0.

L'ordre suivant lequel les souches Hfr transfèrent leurs gènes aux souches F^- peut être reconnu par l'examen de la fig. 1.

Les conclusions de ces données ont été tirées dans le texte.

-o-o-o-o-o-

Tableau 6

ftsA

Nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants								Nombre de colonies analysées	Constitution génétique des recombinants			
		argH	thr leu	fts	lac	trp	his	thyA	malA					
HfrMT1(fts x PA3092	thr leu	-	100	90	25	37	0	1	-	40	thr leu	fts	lac	Nombre
											1	1	1	10
											1	1	1	25
											1	0	1	0
											1	0	0	4
HfrH(TR) x MFT33(fts)	thr leu	-	100	95	35	-	-	-	-	100	thr leu	fts	lac	Nombre
											1	1	1	35
											1	1	0	60
											1	0	1	0
											1	0	0	5
HfrH(TR) x PAT84(fts)	thr leu	-	100	88	14	0	0	0	0	100				
HfrP72G(TR) x PAT84(fts)	thr leu	12	100	90	20	-	2	-	-	40				
HfrML16(TR) x MFT96(fts)	thr leu	10	100	88	46	33	19	19	0	48	thr leu	fts	lac	Nombre
											1	1	1	25
											1	1	0	23
											1	0	1	2
											1	0	0	3

Tableau 6 (suite)

ftsA

Nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants								Nombre de colonies analysées	Constitution génétique des recombinants
		argH	thr leu	fts	lac	trp	his	thyA	malA		
HfrH(TR) x MFT109(fts)	thr leu	-	100	72	48	-	-	-	-	94	thr leu / fts / lac / Nombre 1 1 1 35 1 1 0 20 1 0 1 5 1 0 0 14
HfrP4x6(TR x MFT109(fts)	thr leu	-	100	79	0	-	-	-	-	29	
HfrH(TR) x MFT1(fts)	his	-	42	32	33	27	100	6	0	120	
HfrH(TR) x MFT33(fts)	his	-	42	52	56	61	100	8	-	100	thr leu / fts / Nombre 1 1 39 1 0 3
HfrH(TR) x MFT1182(fts)	his	-	-	55	38	60	100	37	--	98	fts / lac / Nombre 1 1 29 0 1
	trp	-	38	44	28	100	38	-	-	18	thr leu / fts / Nombre 1 1 7 1 0 1
HfrKL16(TR) x MFT1182	trp	-	61	53	-	100	-	-	-	34	thr leu / fts / lac / Nombre 1 1 1 12 1 0 1 1 1 1 0 6 0 1 1 0

Tableau 7

ftsB et G

Nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants										Nombre de colonies analysées	Constitution génétique des recombinants
ftsB			thr leu		lac	trp	fts	his	thy				
HfrH(TR) x MFT84(fts)	thr leu		100		28	16	6	5	0			79	
	his		-		35	60	70	100	4			100	trp fts his Nombre 1 1 1 31 0 1 1 15 1 0 1 10 0 0 1 18
ftsG		pyrA	thr leu	lac	trp	fts	his	thy	mal	xyl	argH		
HfrH(TR) x MFT29(fts)	thr leu pyrA	100	100	-	-	1	-	-	-	-	-	100	
	pyrA	100	65	10	10	7	0	0	-	-	-	100	
	pyrA his	100	50	35	50	65	100	20	-	-	-	60	trp fts his Nombre 1 1 1 30 0 1 1 17 1 0 1 5 0 0 1 12
HfrH(TR) x MFT291(fts)	argH	-	-	31	72	72	69	66	12	26	100	42	trp fts his Nombre 1 1 1 18 1 0 1 3
HfrAT11(TR) x MFT291(fts	his	-	-	0	27	60	100	0	-	-	-		
HfrP4X x CRT115	TR	-	20	-	-	100	61	30	-	-	-	34	

Tableau 8

ftsC

Nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants							Nombre de colonies analysées	Constitution génétique des recombinants			
		thr leu	fts	lac	trp	his	thyA	malA					
HfrH(TR) x MFT108 (fts)	thr leu	100	75	48	43	-	20	2	160	thr leu	fts	lac	Nombre
										1	11	1	57
										1	1	0	57
										1	0	1	15
										1	0	0	21
	lac	26	46	100	-	-	-	-	57	thr leu	fts	lac	Nombre
										1	1	1	10
										0	1	1	12
										1	0	1	5
										0	0	1	27
	his	-	51	40	49	100	40	-					
		thr leu	fts	argH		xyl		mal					
HfrP4X8(TR) x MFT108(fts)	thr leu	100	27	13		15		0	15				

Tableau 9

ftsD

Nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants										Nombre de colonies analysées	Constitution génétique des recombinants
		thr leu	lac	trp	his	nad	thyA	malA	xyl	argH	fts		
HfrH(TR) x MFT1111(fts)	thr leu	100	-	10	0	-	0	-	-	-	0	40	
	trp	37	43	40	7	-	2	-	-	0	0	40	
	thy	24	26	71	71	-	100	-	-	0	0	38	
	argH	44	44	64	39	-	44	18	31	100	26	39	
HfrP72G(TR)x MFT1111(fts)	arg	-	-	-	-	-	-	-	-	100	63	32	
HfrP10(TR)x MFT1111(fts)	malA	-	-	-	-	-	sm^S 56	100		8	16	36	
HfrH(TR) x MFT103(fts)	thr leu	100	-	-	-	-	thyA	-	-	-	0	80	
	nad	24	27	49	13	100	27	13	5	11	11	37	75% de liaison entre argH et fts
HfrP10(TR) x MFT103(fts)	thy	-	-	45	18	50	100	10	12	64	72	67	95% de liaison entre argH et fts

Tableau 10

ftsE

Nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants											Nombre de colonies analysées	Constitution génétique des recombinants			
		thr leu	lac	trp	his	thyA	malA	fts	xyl	mtl	argH	mel		xyl	fts	malA	Nombre
HfrH(TR)x MFT1181(fts)	trp	33	47	100	20	0	-	0	-	-	-	-	30				
	his	33	40	57	100	0	-	0	-	-	-	-	30				
	thy	-	35	68	57	100	0	-	0	-	-	-	37				
	TR	18	33	26	26	22	52	100	89	-	33	30	27				
	arg	22	25	44	44	17	11	11	17	-	100	25	36				
HfrAT13S6 (TR) x MFT1181(fts)	xyl	0	-	-	-	14	25	45	100	85	0	-	77	1 1 1 1	1 1 0 0	1 0 1 0	15 14 2 35
HfrP13(TR)x MFT1181(fts	arg	1	-	-	-	-	-	0	0	0	100	0	55				
HfrG6(TR) x MFT1181(fts)	thy	-	-	-	-	100	19	10	1	1	0	-	74				
HfrH(TR) x MFT123(fts	thr leu	100	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	100				
	trp	-	-	100	-	-	-	0	-	-	0	-	33				
	thy	-	-	-	-	100	-	3	-	-	0	-	30				
	arg	37	20	37	13	23	10	67	-	-	100	23	30				

Tableau 10 (suite)

ftsH

Nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants												Nombre de colonies analysées	Constitution génétique des recombinants
		thr leu	lac	trp	his	thyA	malA	fts	xyl	mtl		argH	mel		
HfrAT13SG(TR) x MFT 123	thy	0	6	20	-	100	30	26	30	-		0	-	30	
HfrP13(TR) x MFT123	arg	-	-	-	-	-	0	0	0	-		100	-	120	
		thr leu	lac	trp	his	thyA	malA	xyl	mtl	fts		argH			
HfrH(TR) x MFT99	thr leu	100	8	-	-	-	-	-	-	0		-		120	
	his	-	-	60	-	15	-	-	-	1		-		100	
	thy	9	30	18	15	100	4	8	-	4		0		27	
	arg	25	-	20	12	15	15	25	-	35		100		40	arg fts xyl Nombre 1 1 1 10 1 1 0 4 1 0 1 0 1 0 0 26
HfrP13(TR) x MFT99(fts)	arg	-	-	-	-	-	-	0	-	0		100		40	
HfrAT13SG(TR) x MFT99(fts)	xyl	-	-	-	-	10	0	100	83	83		0		30	fts mtl xyl Nombre 1 1 1 25 1 0 1 0 0 1 1 0 0 1 1 5

Tableau 11

ftsF

Nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants										Nombre de colonies analysées
		thr leu	lac	trp	his	thyA	malA	xyl	mtl	fts	argH	
HfrH(TR) x MFT1141(fts)	thr leu	100	-	-	-	-	-	-	-	0	0	30
	his	38	30	59	100	6	0	0	-	0	0	34
	argH	50	46	54	-	29	16	29	-	58	100	24
HfrP13(TR) xMFT1141 (fts)	argH	27	-	-	-	0	0	0	0	60	100	48
	thr leu	100	-	-	-	0	0	0	0	21	21	37
HfrAT13SG(TR) xMFT1141(fts)	xyl	-	-	-	-	14	25	100	85	45	0	63

TABLEAU 12

Expériences de transduction par le phage P_1

Locus ftsA

L'ordre des gènes situés sur le segment chromosomique s'étendant de leu à aceF, ainsi que les fréquences de cotransduction entre ces gènes, telles qu'elles ressortent de l'examen du tableau 8, peuvent être figurées comme suit :

Les symboles utilisés pour représenter la constitution génétique des clones transduits sont 1 lorsque l'allèle a été apporté par le phage P_1 transducteur et 0 dans le cas des allèles ariginellement portés par la souche réceptrice.

Tableau 12

Souche donatrice	Souche réceptrice	Sélection	Fréquence de cotransduction entre le caractère sélectionné et le caractère *fts*		Constitution génétique des clones transduits
			Nombre	%	
MPE1(thr$^+$ leu$^+$ TR	MFT1(thr$^-$ leu$^-$ ftsA)	leu$^+$			
	MFT33(" ")	leu$^+$	19TR/56	34	
	MFT96(" ")	leu$^+$	52TR	60	
	MFT109(" ")	leu$^+$	17TR/55	31	
	MFT1182(thr$^-$ pyrA$^-$leu$^-$ftsA)	leu$^+$	15TR/65	23	
	PAT84(thr$^-$leu$^-$ ftsA)	leu$^+$	26TR/60	43	
	MFT33 (" ")	thr$^+$	54TR/115	47	
			0TR/80	1	
MFT1 leu$^+$(ftsA)	C600 (leu$^-$TR)	leu$^+$	17TS/42	40	
ace10 MT961 (leu$^+$ ftsA)	"	leu$^+$	8TS/44	18	
MFT1182 leu$^+$ (ftsA)	"	leu$^+$	14TS/37	38	
PAT84 leu$^+$ ftsA)	"	leu$^+$	7TS/38	18	
MFT33(leu$^+$ ftsA aceF$^+$)	aceF10(leu$^+$ TR aceF$^-$)	ace$^+$	6TS/57	12	leu ftsA ace Nombre 1 1 1 2 0 1 1 4 1 0 1 0 0 0 1 51
MFT96(" ")	"	ace$^+$	39TS/80	48	leu ftsA ace Nombre 1 1 1 12 0 1 1 27 1 0 1 0 0 0 1 41
MFT1182 (" ")	"	ace$^+$	30TS/79	38	leu ftsA ace Nombre 1 1 1 8 0 1 1 22 1 0 1 0 0 0 1 49
MFT1182 leu$^+$ (brnP$^+$ ftsA)	MI1183e (leu$^-$ brnP$^-$ TR)	leu$^+$		47	leu brnP ftsA Nombre 1 1 1 43 1 1 0 26 1 0 1 0 1 0 0 19

TABLEAU 13

Expériences de transduction par le phage P_1

Locus ftsB.

Tableau 13

ftsB

Souche donatrice	Souche réceptrice	Sélection	Fréquence de cotransduction entre le caractère sélectionné et le caractère *fts*	
			Nombre	%
MFT84 (fts, $pabB^+$, man^+ pps^+ $aroD^+$)	AB3303 (TR, $pabB^-$)	$pabB^+$	3TS/120	3
"	AB1360 (TR, $aroD^-$)	$aroD^+$	0/80	
"	K2-t (TR, pps^-)	pps^+	0/78	
"	K63 (TR, man^-)	man^+	0/60	

TABLEAU 14

Expériences de transduction par le phage P_1

Locus ftsC.

Tableau 14

ftsC

Souche donatrice	Souche réceptrice	Sélection	Fréquence de cotransduction entre le caractère sélectionné et le caractère fts
			Nombre
MPE1 (TR, thr^+, leu^+)	MFT108(ftsC, thr^- leu^-	leu^+	OTR/70
"		thr^+	OTR/60
MFT108 (ftsC, leu^+, $aceF^+$, $proA^+$)	C600 (TR, leu^-)	leu^+	OTS/67
"	aceF10 (TR, ace^-)	$aceF^+$	OTS/80
"	AB1360 (TR, $proA^-$)	pro^+	OTS/60

TABLEAU 15

Expériences de transduction par le phage P_1

Locus ftsD.

Nous avons également donné une représentation élargie du segment chromosomique compris entre argH et metA. Les % représentent des fréquences de cotransduction.

-o-o-o-o-o-

Tableau 15

ftsD

Souche donatrice	Souche réceptrice	Sélection	Fréquence de cotransduction entre le caractère sélectionné et le caractère fts	
			Nombre	%
MPE1(TR, $argH^+$)	MFT103 (fts, $argH^-$)	$argH^+$	40TR/100	40
PA255 (TR, $argH^+$	MFT1111 (ftsD, $argH^-$	$argH^+$	6TR/10	20
MFT10338 (ftsD, $argH^+$, rifs, met^+)	RCB6 (TR, $argH^-$, rifr, $metA^-$)	$argH^+$	27TS/72	38

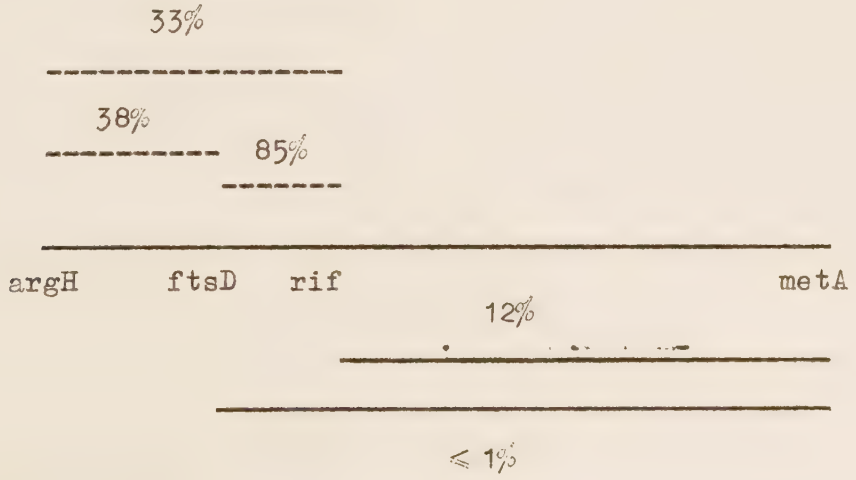


TABLEAU 16

Expériences de transduction par le phage P_1

Locus ftsE

Tableau 16

ftsE

Souche donatrice	Souche réceptrice	Sélection	Fréquence de cotransduction entre le caractère sélectionné et le caractère fts
			Nombre
MFT1181(ftsE, ilv^+)	AB1450(TR, ilv^-)	ilv^+	OTS/80
MFT123(ftsE, ilv^+)	"	ilv^+	OTS/100
MFT99(ftsE; ilv^+)	"	ilv^+	OTS/100
MFT1181(ftsE, $pyrE^+$)	AT1243(TR, $pryE^-$)	$pyrE^+$	OTS/120
MFT123(ftsE, $pryE^+$)	"	$pyrE^+$	OTS/100
MFT99(ftsE, $pryE^+$)	"	$pyrE^+$	OTS/100
MPE1(TR, xyl^+, $argH^+$ $malA^+$)	MFT1181(ftsE, xyl^-)	xyl^+	OTR/120
"	MFT123(ftsE, $malA^-$)	mal^+	OTR/60
"	MFT123(ftsE, $argH^-$)	$argH^+$	OTR/100
"	MFT99(ftsE, $argH^-$)	$argH^+$	OTR/100

TABLEAU 17

Expériences de transduction par le phage P_1

Locus ftsF

Tableau 17

ftsF

Souche donatrice	Souche réceptrice	Sélection	Fréquence de cotransduction entre le caractère sélectionné et le caractère *fts*	
			Nombre	%
MFT1141 (ftsF, ilv^+, $pyrE^+$)	AB1450 (TR, ilv^-)	ilv^+	50TS/125	40
"	AT1243 (TR, $pyrE^-$)	pyrE	0TS/120	1

TABLEAU 18

Expériences de transduction par le phage P_1

Locus ftsG

Tableau 18

ftsG

Souche donatrice	Souche réceptrice	Sélection	Fréquence de cotransduction entre le caractère sélectionné et le caractère *fts*
			Nombre
CRT115(ftsG, pabB$^+$, aroD$^+$, man$^+$)	AB3303(TR, pabB)	pabB$^+$	OTS/150
"	AB1360(TR, aroD$^-$)	aroD$^+$	OTS/100
"	K63(TR, man)	man$^+$	OTS/80
MFT29(ftsG,pabB$^+$, aroD$^+$, man$^+$)	AB3303(TR, pabB$^-$)	parB$^+$	OTS/180
	AB1360(TR, aroD$^-$)	aroD$^+$	OTS/100
	K63(TR, man$^-$)	man$^+$	OTS/60

une souche mutée F⁻- fts un épisome F' porteur de l'allèle sauvage fts⁺.

Dans la plupart des cas, on utilise comme souche réceptrice un dérivé fts qui porte la mutation recA afin d'éviter que des recombinaisons génétiques n'interviennent entre l'épisome et le chromosome.

On utilise en revanche une souche fts rec⁺ si l'on veut prouver la présence de l'allèle sauvage sur l'épisome.

La capacité de former des colonies à 41° et la présence de cellules filamenteuses sont examinées chez les mérozygotes ainsi formés. Le caractère mérozygote de ces souches est vérifié par :

a) la possibilité de retransmettre l'épisome à une autre souche.

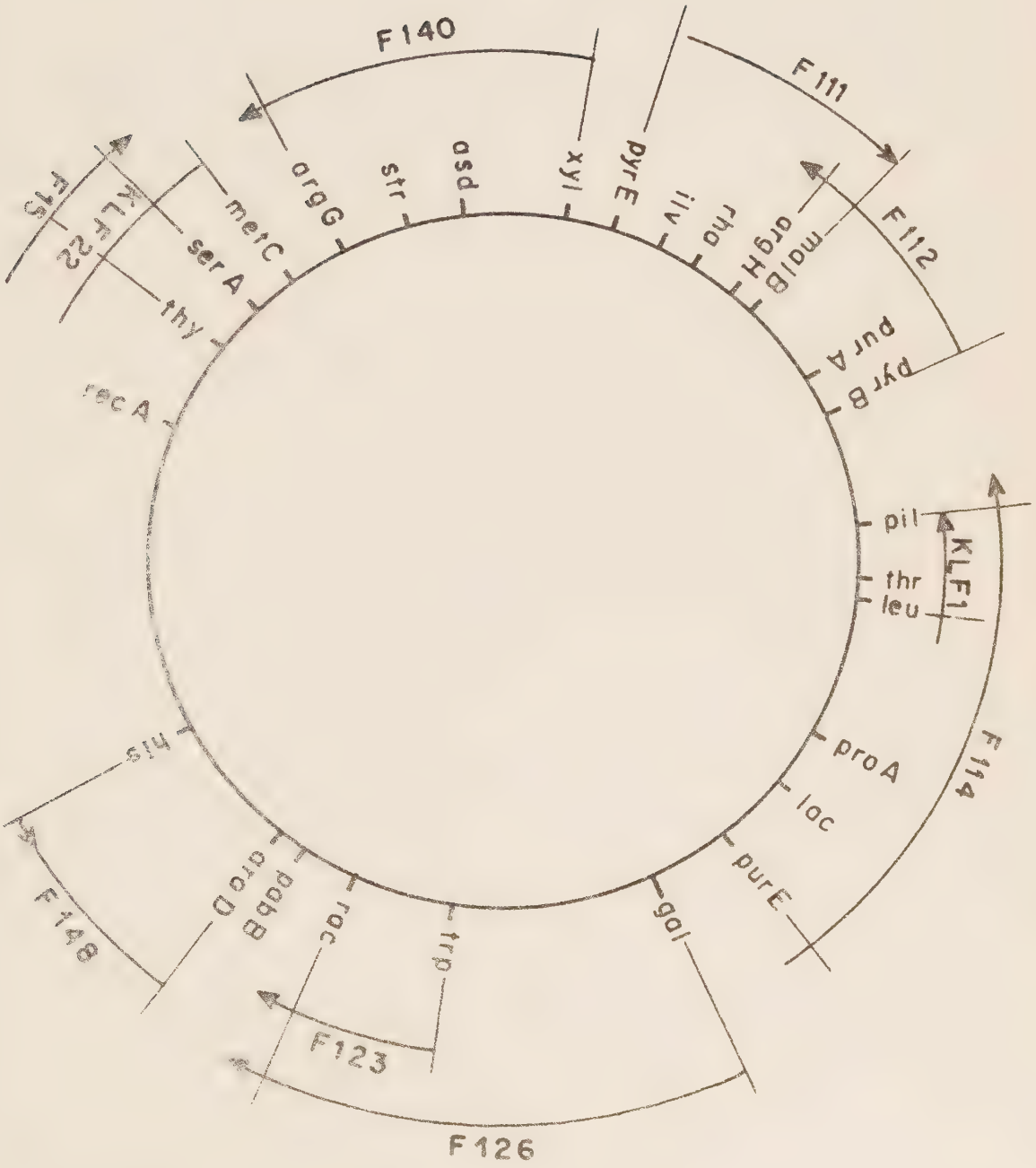
b) L'apparition due à la perte de l'épisome, de cellules F⁻ thermosensibles dans une culture de cellules F' thermo-resistantes(ceci dans le cas où la mutation est récessive par rapport à l'allèle sauvage).

Les épisomes utilisés au cours de cette étude ont été représentés sur la fig. 2.

I) ftsA :

Les croisements de la souche CGSC4266 (F144,ftsA⁺) avec les souches ftsA - recA (MFT1, MFT33, MFT96, MFT109,

La fig. 2 représente les épisomes utilisés au cours de notre étude génétique.


F140
F111
F112
F114
F123
F126
F148
F15
KLF22
KLF1
argG
str
asd
xyl
pyrE
ilv
rho
malB
argH
pyrB
pur A
pil
thr
leu
proA
lac
purE
gal
trp
rac
pabB
aroD
his
recA
thy
serA
metC

MFT1182,PAT84) ont montré, d'après les critères définis ci-dessus que la mutation ftsA était récessive par rapport à l'allèle sauvage.

Pour cela, on a sélectionné et réisolé, à 30° des clones mérozygotes de phénotype thr^+ - leu^+ (de génotype $F\text{-}thr^+ara^+leu^+ftsA^+ / thr^- ara^+ leu^- ftsA^-$) et on a montré que ces clones étaient thermorésistants (de 20 à 40 clones ont été examinés selon les cas).

La présence de l'épisome F140 chez ces mérozygotes thermorésistants a été vérifée en croisant ces derniers avec la souche W4573 (ara^-) . On obtient ainsi des mérozygotes ara^+.

Lorsque des clones $ftsA^+/ftsA^-$ sont cultivés pendant plusieurs générations en milieu riche à 30°, des cellules F $ftsA^-$ qui ont perdu l'épisome et qui sont désormais thermosensibles apparaissent dans la culture. L'étalement de ces cultures à la surface de boites de Pétri permet, en effet, de montrer par la technique des doubles répliques, que I à 5% des colonies formées sont thermosensibles et ont perdu la capacité de transmettre le caractère ara^+ à la souche W4573.

La mutation ftsA est donc bien récessive par rapport à l'allèle sauvage.

2) FtsB :

Aucun des épisomes actuellement disponible ne porte les gènes pabB et ftsB. Ceci a été constaté notamment pour les épisomes F123 (souche CGSC4256), F126 (CGSC4253) et F148 (souche CGSC4301) fig.2. Il n'a donc pas été possible de déterminer le caractère de la souche mérozygote ftsB$^+$ / ftsB$^-$.

3) ftsC :

Les croisements des souches MFT108 et MFTI08 recA avec la souche CGSC4266 (F144) menés parallèlement aux croisements décrits au § 1, ont montré de façon similaire que la mutation ftsC était récessive devant l'allèle sauvage.

4) ftsD :

La mutation ftsD est dominante par rapport à l'allèle sauvage. Le gène ftsD est le seul parmi les gènes fts à présenter cette caractéristique.

Cette conclusion repose sur les faits suivants :
i) les mézorygotes fts$^+$ /ftsD sont thermosensibles$^-$ l'épisome F112 (de la souche POP468) ayant été introduits à 30° chez les souches MFT103-recA et MFT1111-recA, tous les mérozygotes arg$^+$ examinés (40 par croisement) étaient thermosensibles.

ii) l'allèle ftsD$^+$ figure bien parmi les gènes portés par l'épisome introduit: la présence de l'allèle sauvage ftsD$^+$ sur l'épisome F112 est attestée par l'apparition de recombinants thermorésistants (10 parmi 35 clones arg$^+$) lorsque cet épisome est introduit chez les souches MFT103 rec$^+$ et MFT1111rec$^+$. Ces recombinants ne peuvent provenir que d'un phénomène de recombinaison entre l'épisome et le chromosome de la souche réceptrice. Il est en effet exclu que les souches MFT103 et MFT1111 aient reçu tout ou partie du chromosome de la souche POP468 (recA) qui ne peut engendrer des cellules Hfr.

iii) l'introduction chez une souche thermorésistante d'un épisome portant la mutation ftsD rend cette souche thermosensible.

Le croisement POP468 (F112) x MFT103 (rec$^+$) a permis d'introduire l'allèle muté ftsD sur l'épisome F112. En effet, parmi 35 clones arg$^+$ malB$^+$ obtenus, on en trouve 3 qui engendrent des mérozygotes arg$^+$mal$^+$ thermosensibles lorsqu'ils sont croisés à leur tour avec la souche thermorésistante POP577 (argH$^-$, malB$^-$, recA$^-$). Ces mérozygotes forment des filaments à 41° et arrêtent immédiatement de se diviser. Ils se comportent en cela de la même manière que la souche parentale MFT103 (fig.10) (expériences de dénombrement réalisées avec un coulter counter). Cultivés en

milieu riche, ces clones donnent naissance à des cellules F⁻arg⁻mal⁻ thermorésistantes.

La mutation ftsD est donc bien dominante par rapport à l'allèle sauvage.

5) FtsE :

Il a été montré que la mutation ftsE de la souche MFT1181 était récessive par rapport à l'allèle sauvage.

Parmi 35 clones xyl⁺ réisolés à l'issue d'un croisement entre les souches CGSC4289 (F140) et MFT1181 (rec⁺) 5 étaient tout à la fois thermorésistants et mérodiploïdes. Ces clones sont en effet susceptibles de retransmettre le caractère xyl⁺ à la souche W4573. Cultivés en milieu complet, ils perdent rapidement leur épisome et la thermorésistante qui lui est associée.

La fréquence relativement faible (5/35) des clones F'xyl⁺TR peut être expliquée d'une part par l'instabilité connue de l'épisome F140, d'autre part par les délétions fréquentes qui s'y produisent et enfin par l'usage d'une souche réceptrice rec⁺ qui peut engendrer des recombinants xyl⁺ haploïdes.

6) FtsF :

Ni l'épisome F140 (souche CGSC4289), ni l'épisome F111 (CGS4258) ne portent le segment de chromosome

ftsF-pyrE (Ceci a été vérifié en croisant ces souches avec la souche MFT114 rec$^+$) . Il n'a donc pas été possible de déterminer si la mutation ftsF était dominante ou récessive par rapport à l'allèle sauvage.

7)ftsG :

L'introduction de l'épisome F123 (CGSC4258) chez les souches CRT115, MFT29 et MFT29 recA leur confère le phénotype thermorésistant et montre donc que les mutations ftsG sont récessives par rapport à l'allèle sauvage.

Les mérozygotes ainsi obtenus sont capables de transmettre l'épisome F123 à la souche PA3092 (sélection trp$^+$) et segrègent des cellules F$^-$ thermosensibles. Le gène ftsG est donc bien distinct du gène ftsB, qui lui, n'est pas porté par l'épisome F123.

o

Cette analyse génétique a donc révélé l'existence de 7 locus génétiques distincts parmi seulement 16 mutants de type fts et permis de distinguer sans ambiguité entre des mutants d'aspects morphologiques très semblables.

Si le locus ftsA regroupe un nombre important de mutants (6), en revanche les locus ftsB, C et F par exemple n'ont qu' un seul représentant. Il est donc presque

certain que l'on pourrait trouver d'autres locus de type fts en augmentant le nombre des mutants analysés.

Si l'on considère ces mutants du point de vue fonctionnel on remarque que parmi toutes les mutations examinées, seules celles appartenant au locus ftsD sont dominantes par rapport à l'allèle sauvage. Diverses hypothèses peuvent expliquer la dominance d'une mutation retenons-en deux ici :

a) la mutation ftsD pourrait affecter un gène de régulation et provoquer la synthèse d'un super-suppresseur qui bloque l'expression d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la division.

b) la mutation fts pourrait affecter un gène qui dirige la synthèse d'une structure cellulaire (paroi, membrane, site régulateur, septum, etc...). La coexistence chez le mérozygote d'éléments normaux et d'éléments altérés ne permettant pas dans ce cas d'obtenir une structure fonctionnelle.

La conclusion de cette étude est donc qu'il existe un nombre élevé de fonctions dont l'altération provoque un arrêt de la division cellulaire sans pour autant inhiber ni la croissance ni la synthèse et la répartition des noyaux. C'est cette classification génétique qui servira de base aux études décrites dans les chapitres suivants.

*

* *

CHAPITRE 3

ETUDE PHYSIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE

Introduction

L'étude génétique des mutants que nous avons isolés nous a permis de reconnaître l'existence d'un certain nombre de fonctions distinctes dont l'altération se traduit par l'arrêt de la division cellulaire. Par ailleurs, le seul fait marquant qui ressorte de l'étude morphologique est l'absence complète de septum intercellulaire chez les cellules filamenteuses formées.

Il nous faut maintenant nous interroger sur la nature des fonctions mutées. Pour cela, nous allons tout d'abord examiner plus en détail les propriétés de ces mutants. Aucune de leurs caractéristiques physiologiques ou biochimiques n'étant connues, nous passerons en revue les principales d'entre elles, à savoir : la survie des cel-

lules à haute température en fonction du temps (§ II), l'évolution des synthèses macromoléculaires (DNA, RNA, protéines, muréine , § III) et la reversibilité de l'inactivation de la division (§ IV et V).

Le nombre élevé des gènes qui ont déjà été identifiés, ainsi que l'observation du déroulement du cycle cellulaire laissent supposer que l'inhibition de la division peut être provoquée par des causes nombreuses et variées, par exemple par des défauts de la structure de la paroi ou de la membrane cytoplasmique, par des défauts enzymatiques, des altérations des mécanismes régulateurs qui coordonnent les étapes successives de la division, etc... En effet, d'après le modèle du replicon présenté par Jacob, Brenner et Cuzin (1963) la membrane cellulaire pourrait assurer la coordination des diverses étapes du cycle cellulaire. Nous avons vu, au cours de l'Introduction, que des altérations de la membrane cellulaire avaient été reconnues chez des mutants qui cessent de synthétiser leur DNA. L'un d'eux, CRT46 (dnaA) présente notamment une sensibilité accrue à l'égard du déoxycholate de sodium, ainsi que des modifications de structure qui permettent à un colorant fluorescent (l'ANS) d'accéder plus facilement à des sites protéiques, normalement masqués chez la souche sauvage. Nous examinerons donc l'effet de ces agents sur nos mutants de

division (§ VI et VII).

On connaît également un certain nombre de composés qui sont susceptibles d'arrêter la division cellulaire. C'est le cas par exemple du crystal violet, de la mitomycine C, de certains D-amino acides et de divers antibiotiques. Parmi eux, la pénicilline semble digne d'intérêt puisque son mode d'action est mieux connu et que l'on sait notamment qu'elle agit au niveau de la paroi cellulaire sur au moins deux cibles enzymatiques (§ IX). Nous verrons que son action permet de reconnaître deux catégories parmi les mutants de division.
Le champ d'investigation reste naturellement très vaste mais son exploitation est maintenant tributaire des progrès réalisés dans divers domaines biochimiques, celui des enzymes de la paroi cellulaire notamment. Des études actuellement en cours visent à détecter l'absence éventuelle de l'un de ces enzymes chez les mutants de séptation (§ X).

On connaît enfin quelques fonctions qui peuvent dans certains cas être en relation directe ou indirecte avec le processus de la division, sans que l'on ait pu identifier la nature de cette relation. C'est le cas notamment de la fonction recA et de l'induction du prophage γ. L'étude de l'interaction entre ces fonctions et une série de mutations affectant la division cellulaire permettra de généraliser ces observations (§ XI et XII).

Au cours de l'exposé qui va suivre, nous rassemblerons tout d'abord les résultats qui concernent les mutants de la série fts (filaments multinucléés), puis nous reprendrons les divers points examinés en les appliquant à l'étude du mutant MFT100 de type parB.

*

* *

A/ Mutants de type fts

1. Formation de cellules filamenteuses à haute température.

Chez tous les mutants de type fts que nous avons étudiés, le processus normal de la division cellulaire s'arrête immédiatement lorsque la température d'incubation est portée de 30 à 41°. Pendant 120 min. de culture à 41°, l'accroissement résiduel du nombre de cellules (mesuré à l'aide d'un Coulter counter) ne dépasse pas 5 à 20%. Durant le même laps de temps, les densités optiques des cultures à 30 et à 41°, ainsi que le nombre de cellules à 30° augmentent d'environ 10 fois.

A haute température, il se forme donc de longues cellules filamenteuses dont la taille peut dépasser 40 µ de long, tandis qu' à 30° la longueur des cellules avoisine 2 µ.

Cette description s'applique à tous les mutants des locus ftsA, ftsD, ftsE, ftsF, et ftsG. Dans le cas de mutants de type ftsB (MFT84) et ftsC (MFT108), on remarque que des divisions cellulaires anormales se produisent parfois aux extrémités des filaments. Des cellules de 2 µ de long dépourvues de DNA sont alors formées et provoquent ainsi un accroissement supplémentaire de la population de 5 à 25%.

2. Survie à haute température.

La survie des cellules filamenteuses formées à 41° a été estimée en comptant le nombre de colonies formées à 30° sur des boîtes de milieu complet par des échantillons prélevés à intervalles réguliers dans une culture incubée à 41°.

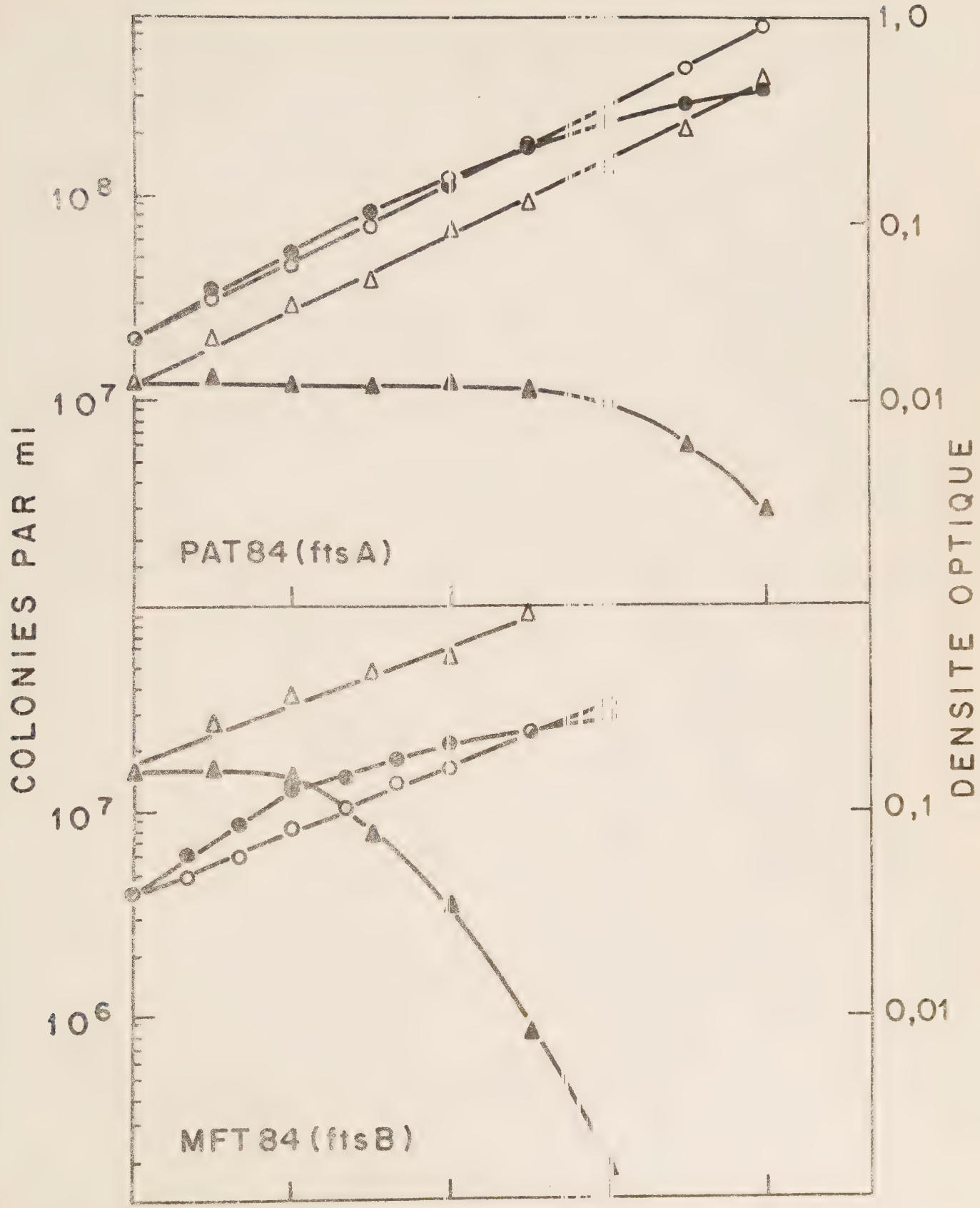
Dans tous les cas examinés, le nombre des cellules survivantes demeure constant pendant les 60 premières minutes d'incubation à 41°. Ce nombre décroît ensuite de façon exponentielle en fonction du temps, tandis que le taux de croissance diminue également , figure 3. Le temps d'incubation critique, après lequel une fraction croissante des cellules perdent à 41° le pouvoir de se multiplier à 30°, dépend de la mutation étudiée et du taux de croissance de la souche. Une étude cinétique de ce phénomène sera présentée plus loin (§ IV).

3). Synthèses macromoléculaires.

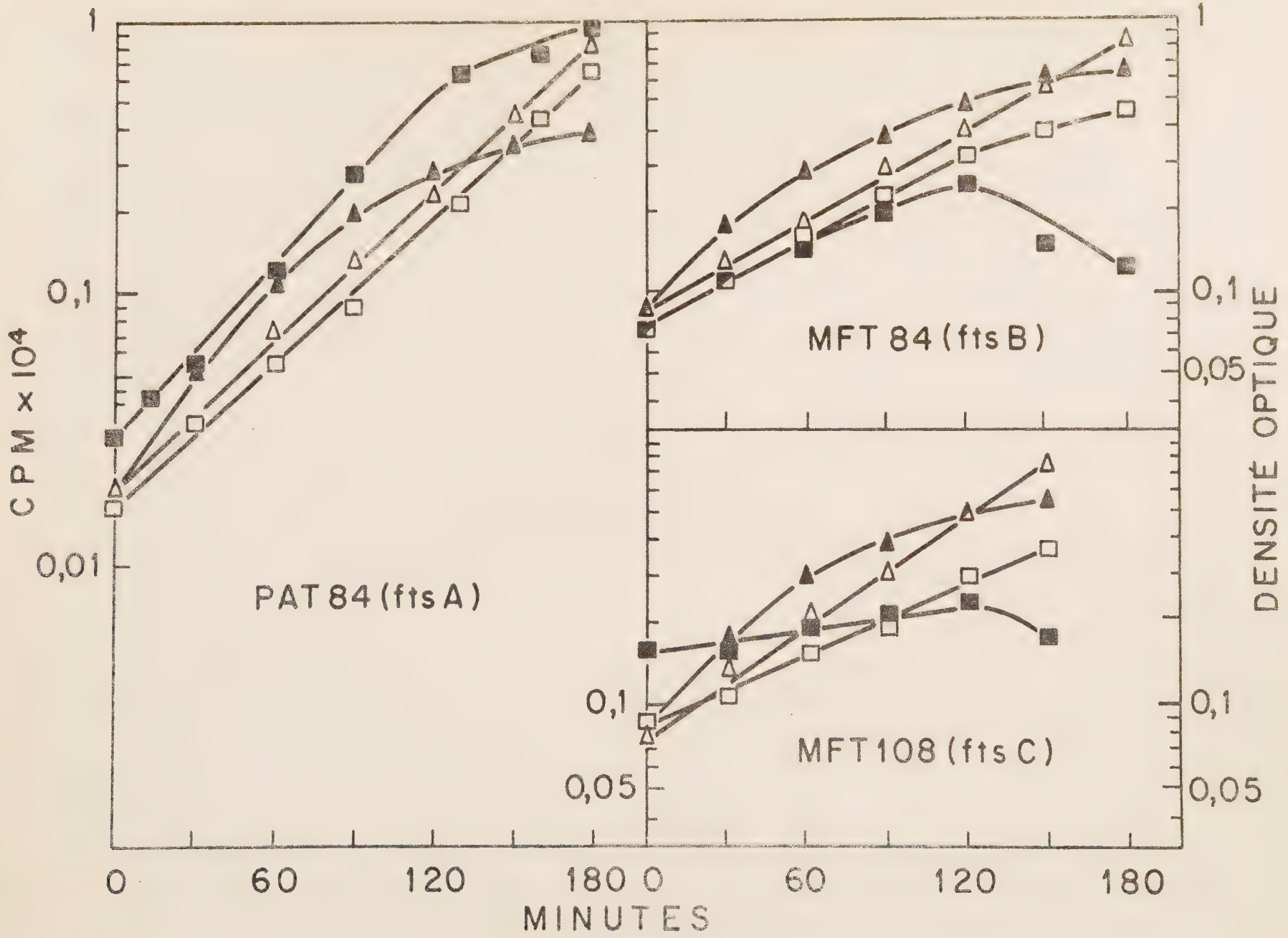
Les taux de synthèse du DNA, du RNA et de la masse cellulaire ont été comparés à 30 et à 41° en mesurant les taux d'incorporation des précurseurs radioactifs correspondants et la densité optique de la culture. On a procédé pour cela à des marquages brefs (3 à 5 min.) avec de la thymidine - ^{3}H ou de l'uracile - ^{14}C (cf.

La fig. 3 représente la survie en fonction du temps de deux souches représentatives. Les cellules sont cultivées en milieu liquide à 30 ou à 41° et des échantillons prélevés à intervalles réguliers sont dilués et étalés à la surface de boites de milieu complet incubées à 30°. Le nombre de colonies formées est compté apres 24-36hrs.

- nombre de colonies par ml à 30° (Δ—Δ) et à 41° (▲—▲)
- densité optique de la culture (absorption à 550 mμ dans des cuves de 0,5 cm de trajet optique) à 30° (o—o) et à 41° (●—●)


COLONIES PAR ml
DENSITE OPTIQUE
10^8
10^7
10^7
10^6
1,0
0,1
0,01
0,1
0,01
PAT 84 (fts A)
MFT 84 (fts B)

- Taux d'incorporation de la thymidine ^{3}H au cours de marquages brefs (4') à 30° (□—□) et à 41° (■—■)
- Densité optique des cultures (absorption à 550 mμ dans des cuves de 0,5 cm de trajet optique) à 30° (Δ—Δ) et à 41° (▲—▲).


1
0,1
0,01
CPM x 10⁴
PAT 84 (fts A)
MFT 84 (fts B)
MFT 108 (fts C)
0,1
0,05
DENSITÉ OPTIQUE
0
60
120
180
MINUTES

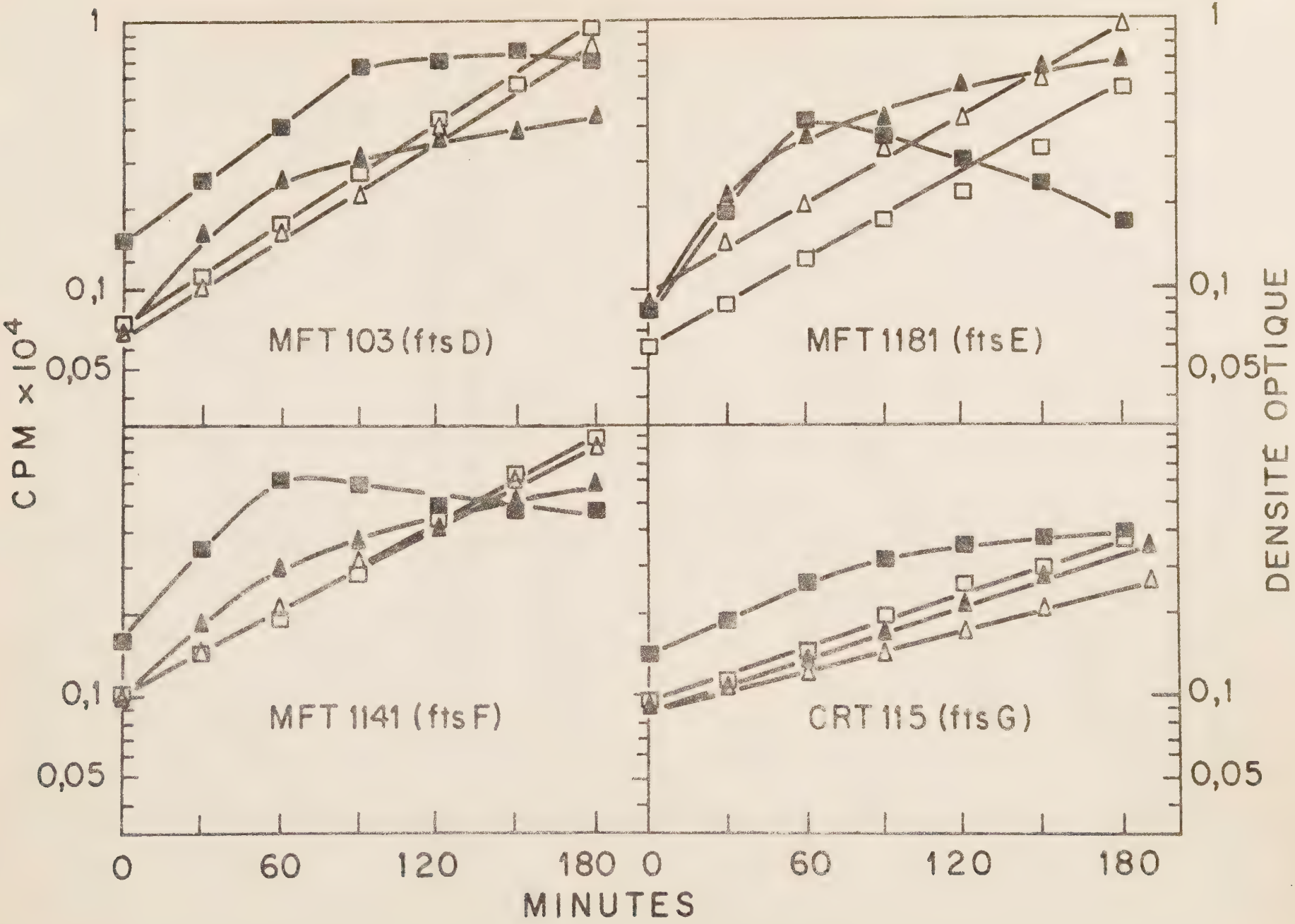
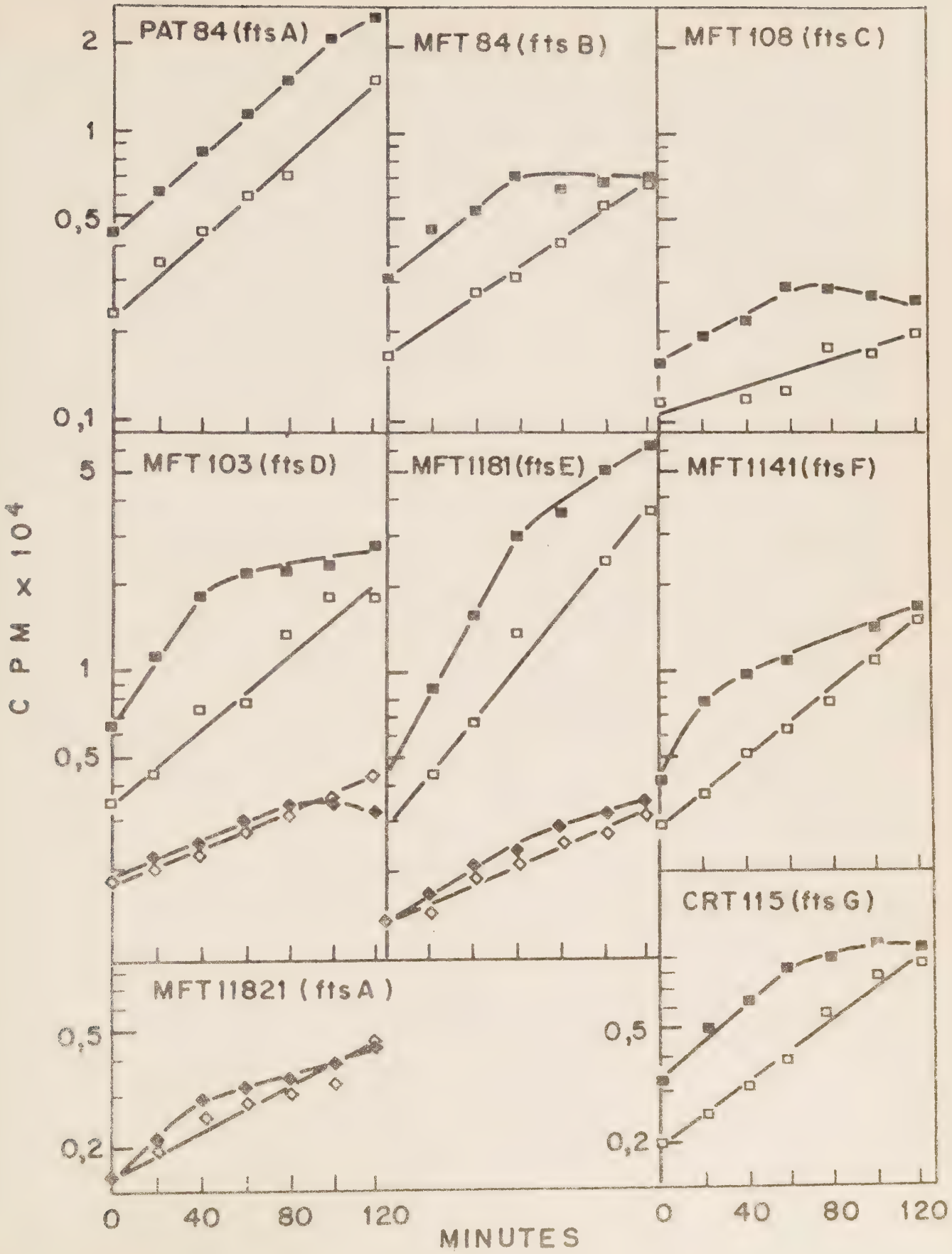

1
0,1
0,05
CPM x 10⁴
MFT 103 (fts D)
MFT 1181 (fts E)
MFT 1141 (fts F)
CRT 115 (fts G)
DENSITE OPTIQUE
0
60
120
180
MINUTES

Fig. 6. Taux d'incorporation de l'Uracile ^{14}C à haute et à basse température au cours de marquages brefs (4'), à 30° (□–□) et à 41° (■–■).
Incorporation de l'acide α-ε diaminopimélique ^{14}C au cours d'un marquage total, à 30° (◇–◇) et à 41° (◆–◆).


PAT 84 (fts A)
MFT 84 (fts B)
MFT 108 (fts C)
MFT 103 (fts D)
MFT 1181 (fts E)
MFT 1141 (fts F)
CRT 115 (fts G)
MFT 11821 (fts A)
2
1
0,5
0,1
5
1
0,5
0,5
0,2
0,5
0,2
C P M x 10⁴
0
40
80
120
0
40
80
120
MINUTES

Matériel et Méthodes).

Dans plusieurs cas, on a également mesuré le taux de synthèse de la muréine de la paroi cellulaire en suivant l'incorporation totale du DAP -^{14}C dans des cellules préalablement marquées. On utilise ici des dérivés dap$^-$ lys$^-$ des mutants fts. La mutation lys$^-$ prévient en effet la transformation de l'acide diamino-pimélique en lysine et par conséquent son utilisation par le métabolisme cellulaire à d'autres fins que la synthèse de la paroi. Les résultats montrent que chez tous les mutants à l'exception de MFT108 (le seul mutant connu au locus ftsC) les synthèses macromoléculaires examinées se poursuivent normalement à 41° de façon exponentielle pendant au moins 60 min.

Dans le cas du mutant MFT108, le DNA continue à être synthétisé à 41°, mais à un taux inférieur à celui de l'accroissement de la masse cellulaire.

Ces expériences, qui sont représentées sur les fig. 4 à 6, permettent donc de vérifier que l'absence de division cellulaire chez les mutants de type fts n'est pas un effet secondaire de l'arrêt de l'une des synthèses macromoléculaires envisagées.

4. Etude de la reversibilité de l'inhibition de la division cellulaire, en présence et en absence de synthèses protéiques.

Ces expériences ont pour but de comparer chez les divers types de mutants la survie du "potentiel de division" qui permet éventuellement aux filaments formés à 41° de se diviser à nouveau lorsqu'on les ramène à 30°. Dans le cas où la division cellulaire reprend à 30°, nous pouvons être en présence :

a) d'une inactivation reversible d'un "facteur" quelconque qui intervient dans la division.

2) d'une inactivation thermique irréversible de ce facteur pouvant être compensée par la synthèse de novo à 30° de facteurs protéiques actifs. La sensibilité de la restauration de la division à l'égard du chloramphénicol nous permettra de distinguer entre ces deux hypothèses.

En revanche, lorsque la division ne reprend pas à 30°, même en l'absence de chloramphénicol, il s'agit alors d'une inactivation thermique qui entraîne une lésion irréversible du "potentiel de division" de la cellule.

Ces expériences ont été réalisées de la manière suivante : des cellules filamenteuses sont tout d'abord formées au cours d'une période d'incubation à 41° de 60 à 90 min. La culture est ensuite divisée en quatre parties :

deux sont ramenées à 30° et au même moment, on ajoute du chloramphénicol (75-100 γ/ml) à l'une d'elles. Les deux autres sont conservées à 41° avec ou sans chloramphénicol.

Le nombre et la taille des cellules sont déterminés à intervalles réguliers à l'aide d'un Coulter-counter (cf.Matériel et Méthodes).

Une culture témoin gardée à 30° tout au long de l'expérience permet de mesurer le taux de croissance normal de la souche étudiée.

Ces expériences ont montré que l'on obtenait des réponses extrêmement variées suivant le type de mutant étudié et le temps de préincubation à 41°. Si l'on compare les comportements des mutants après des temps de préincubation identiques, on peut reconnaître trois types de réponses :

i) le premier type de réponse, celui des mutants de type ftsA et ftsE, est une division rapides des filaments à 30°, division qui n'est pas inhibée par le chloramphénicol et qui est donc susceptible de se produire en l'absence de synthèses protéiques. Un mutant de ce type a été décrit par ailleurs (Reeves, Groves et Clark,I970).

ii) le deuxième type de réponse est fourni par les mutants de type ftsD dont les filaments ne se divisent à 30° qu'à condition que des synthèses protéiques de

novo puissent avoir lieu.

iii) le troisième type de réponse est une restauration très faible de la division cellulaire à 30°, inexistante même si le temps de préincubation à 41° dépasse 70-80 min. C'est ce qui a été observé chez les mutants de type ftsB, ftsC, ftsF et ftsG.

Il est intéressant de noter que, jusqu'à présent, tous les mutants appartenant à un même locus génétique ont fourni des réponses similaires. Les fig.7 à 12 illustrent des exemples caractéristiques du comportement d'un mutant de chaque locus. Quelques détails supplémentaires sont donnés ci-dessous :

a) ftsA :

Chez les mutants étudiés (MFT96, MTII82 et PAT84, fig.7) la division à 30° des cellules qui ont formé des filaments à 41° reprend dans un délai très bref (10 à 15 min.) et le nombre de cellules rejoint rapidement celui de la culture témoin gardée à 30° depuis le début de l'expérience. L'addition de chloramphénicol (100 γ/ml) au moment du changement de température arrête immédiatement la croissance, mais permet une augmentation de 80 à 150% du nombre de cellules. Chez la souche sauvage et chez les mutants cultivés à 30°, l'accroissement résiduel qui suit l'addition de chloramphénicol n'excède pas

20 à 25%. La différence observée est suffisamment importante pour que l'on puisse conclure que les filaments de type ftsA et ftsE sont capables de se diviser à 30° en l'absence de synthèses protéiques de novo. Les divisions cellulaires s'effectuent donc à l'aide de facteurs inactivés de façon reversible à 41°.

b) ftsB :

Lorsque le mutant MFT84, le seul connu au locus ftsB, est remis à croître à 30° après 80 min. d'incubation à 41°, les filaments formés sont incapables de se diviser (fig.8). Pour des périodes de préincubation plus courtes (60 min.), on observe après un délai de 60 min. une restauration de la division cellulaire lente et partielle qui, pour autant que l'on puisse en juger, est sensible à l'action du chloramphénicol.

c) ftsC :

Le comportement du mutant MFT108 (fig.9) est tout à fait comparable à celui du mutant MFT84 décrit ci-dessus.

d) ftsD :

Dans le cas des deux mutants MFT103 (fig.IO) et MFT1111, l'inhibition de la division cellulaire est réver-

sible à 30° après 60 min. de préincubation à 41°. Le mutant MFT103 se divise après un certain délai (40-50 min.) tandis que le mutant MFT1111 dont le taux de croissance est plus élevé, se divise 25 min. après l'abaissement de la température.

Toutefois, dans les deux cas, l'addition de chloramphénicol (100γ /ml) inhibe complètement le processus de restauration. En effet, la division cellulaire résiduelle observée (0-10% pour MFT103, 20% pour MFT1111) reste inférieure à celle qui suit l'addition du chloramphénicol à une culture du type sauvage (20 - 25%, fig.7).

Dans ce cas, la synthèse de novo de facteurs intervenant dans la division cellulaire est donc nécessaire à la restauration de la division.

e) ftsE :

L'exemple donné sur la fig. 11 montre que les filaments formés à 41° par le mutant MFT1181 sont capables de se diviser à 30°, même en présence de chloramphénicol.

f) ftsF :

La fig. 12 montre que la souche MFT1141, la seule connue au locus ftsF , ne se divise que très partiellement, et après un long délai, lorsque des cellules cultivées 60 min. à 41° sont remises à croître à 30°.

En présence de chloramphénicol, le nombre de cellules n'augmente pas de plus de 10% par rapport à celui de la culture conservée à 41°.

g) ftsG :

La restauration de la division cellulaire des filaments de la souche CRT115 ramenée à 30° après 60 min. d'incubation à 41° est lente et partielle (fig.7). Elle n'est pas observée si le séjour à 41° excède 100 min. L'addition de chloramphénicol permet un accroissement du nombre cellulaire de 10% par rapport à celui de la culture conservée à 41°, accroissement dont il est difficile d'apprécier la signification compte tenu du faible taux de croissance de cette souche.

Dans tous les cas examinés (fts A à G), l'addition de chloramphénicol à 41°, suivie du maintien de la culture à haute température, provoque l'arrêt de la croissance, le nombre de cellules restant constant.

5) Division à 30°, en l'absence de synthèse d'acide désoxyribonucléique des filaments formés à 41° par une souche reversible.

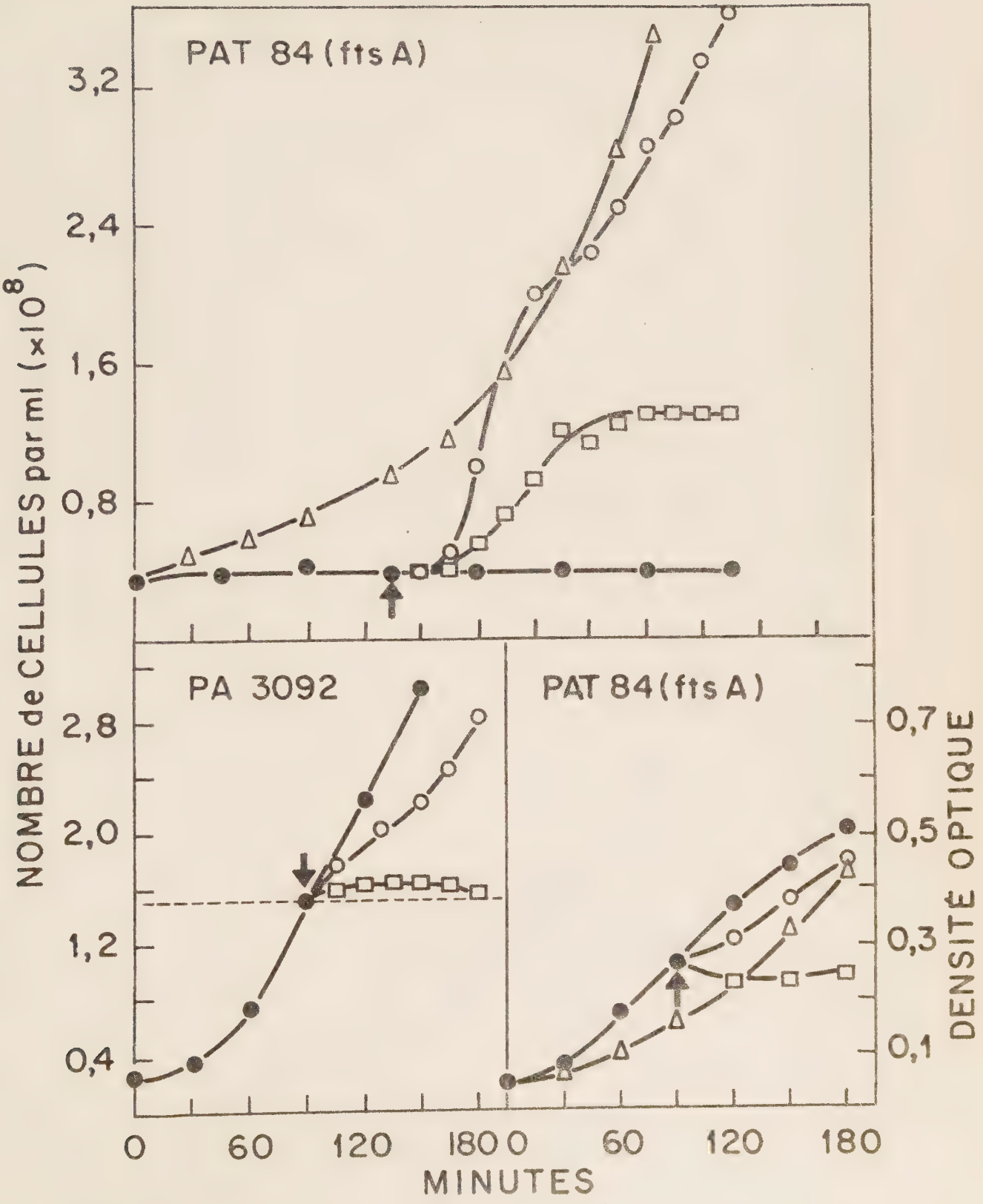
On sait (§ IV) que les filaments formés à 41° par les cellules du mutant PAT84 (ftsA) sont capables de se diviser à nouveau à 30° en présence et en absence de synthèses

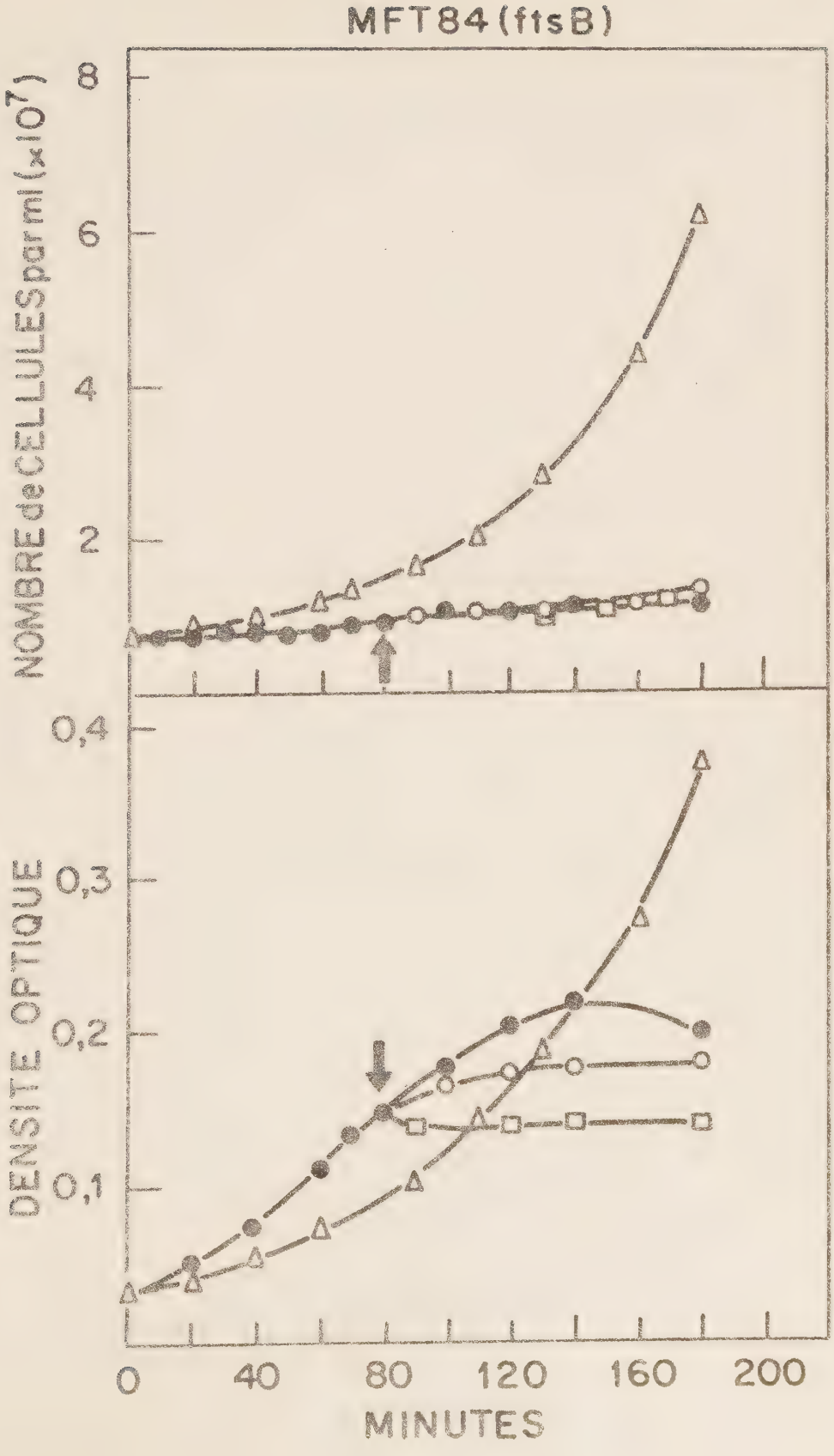
Fig. 12. Etude cinétique de la division cellulaire

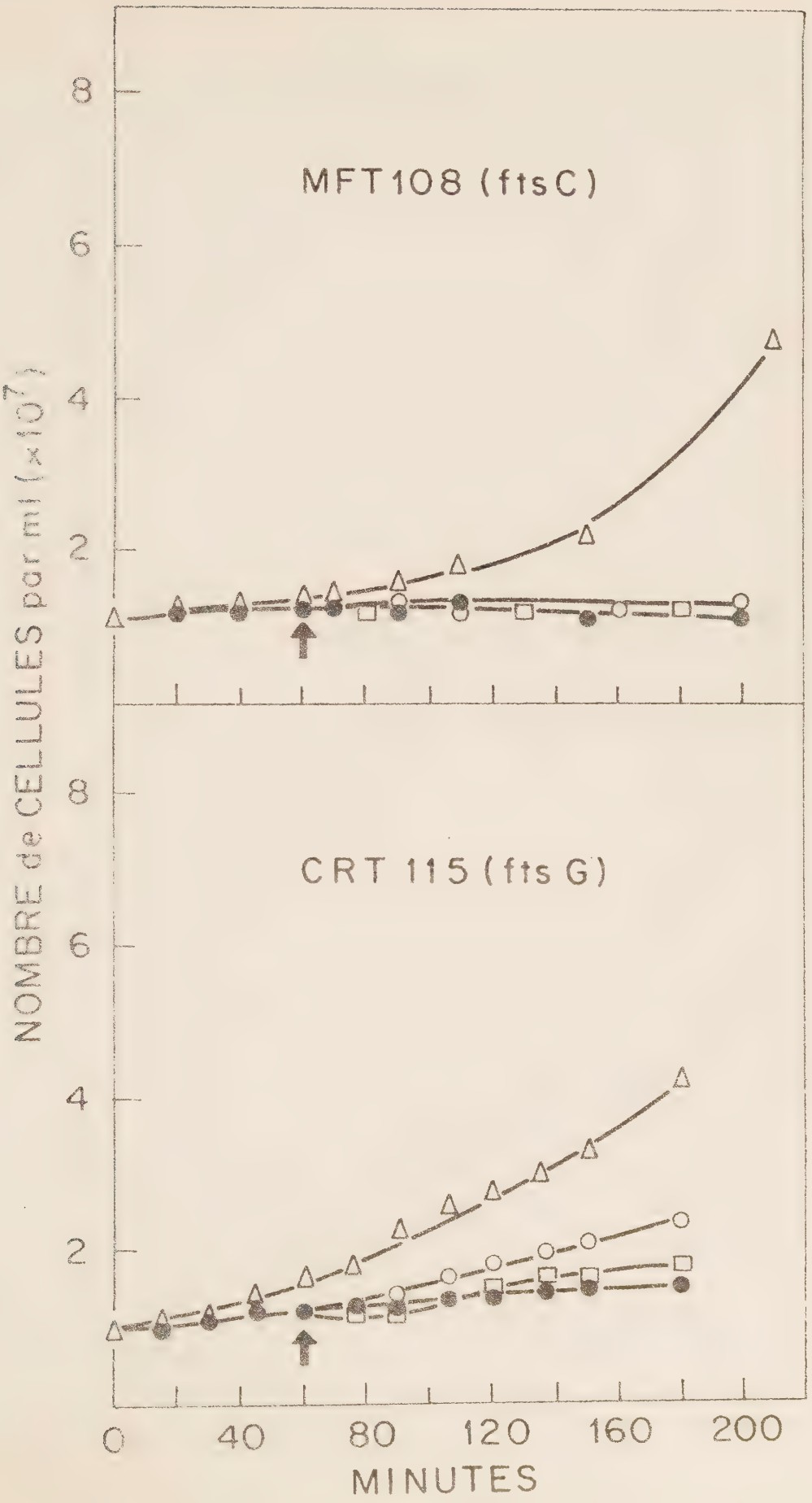
Des cellules sont incubées à 41° (●—●). Après un certain temps (↑) on ramène deux échantillons à 30° avec (□—□) ou sans (o—o) addition de chloramphenicol.

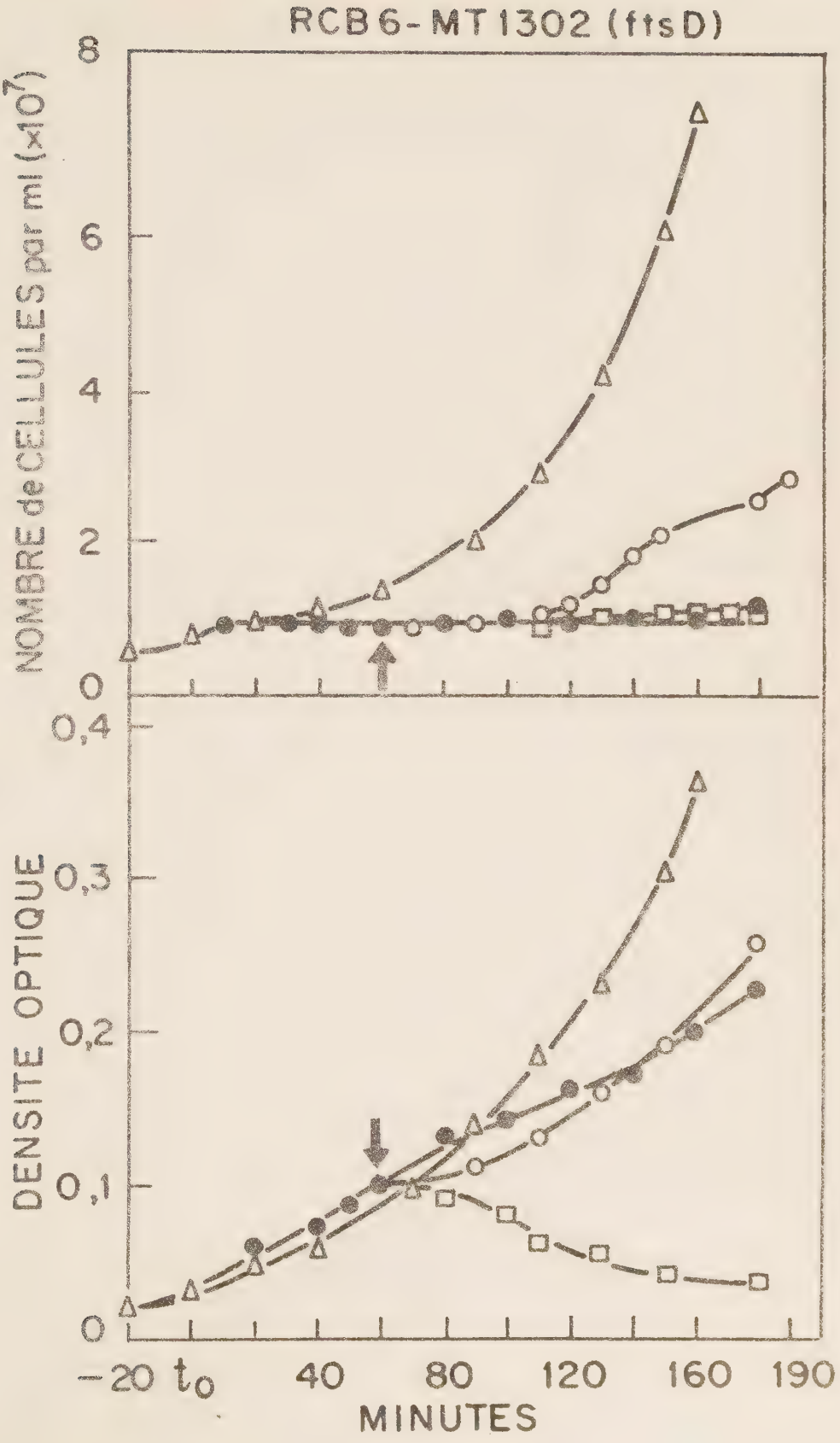
Une culture controle (Δ—Δ) est conservée à 30° tout au long de l'expérience

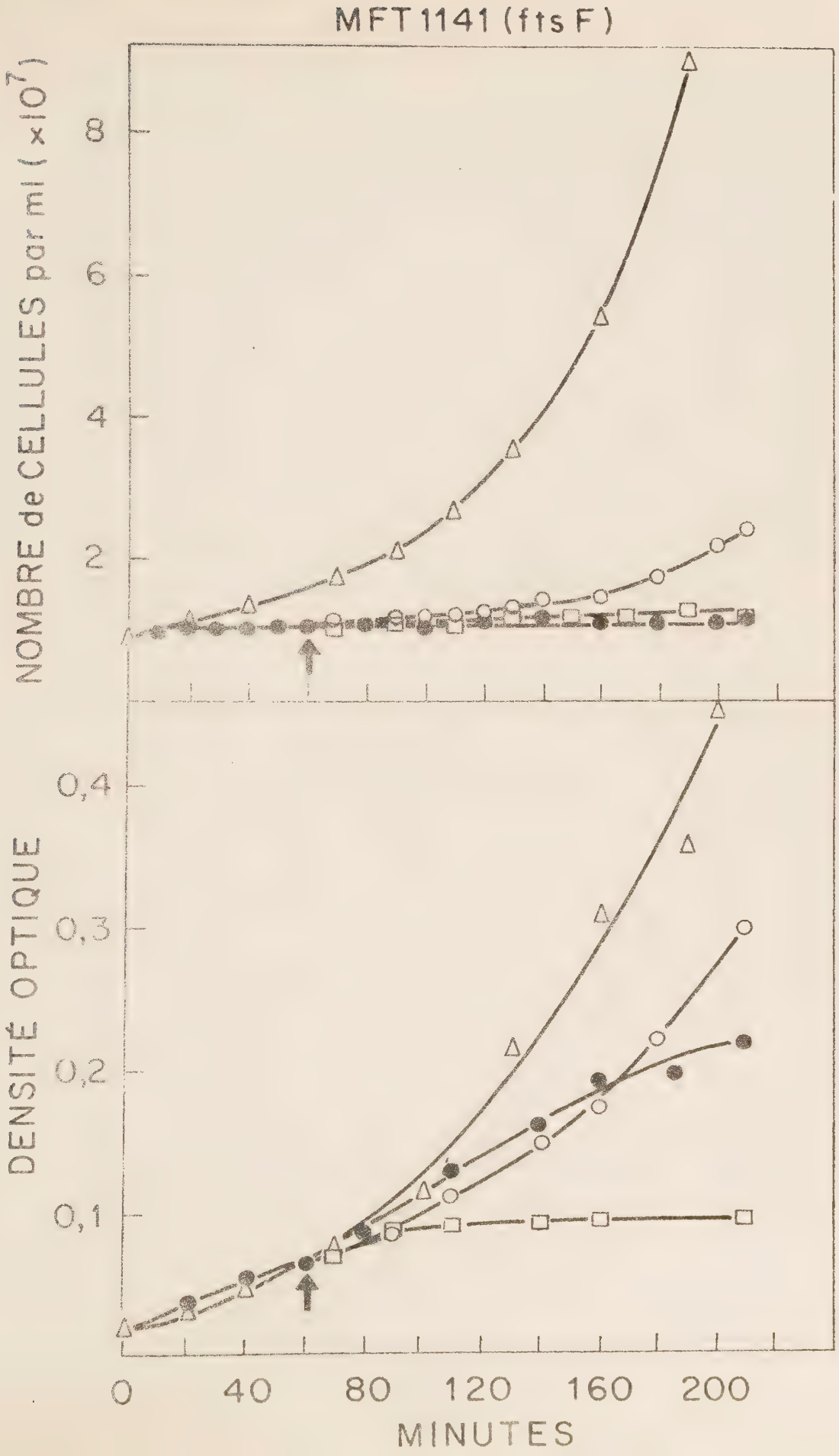
Sont représentés : le nombre de cellules par ml de culture (mesuré à l'aide d'un coulter-counter), et la densité optique des cultures (absorption à 550 mμ dans des cuves de 0,5 cm de trajet optique)

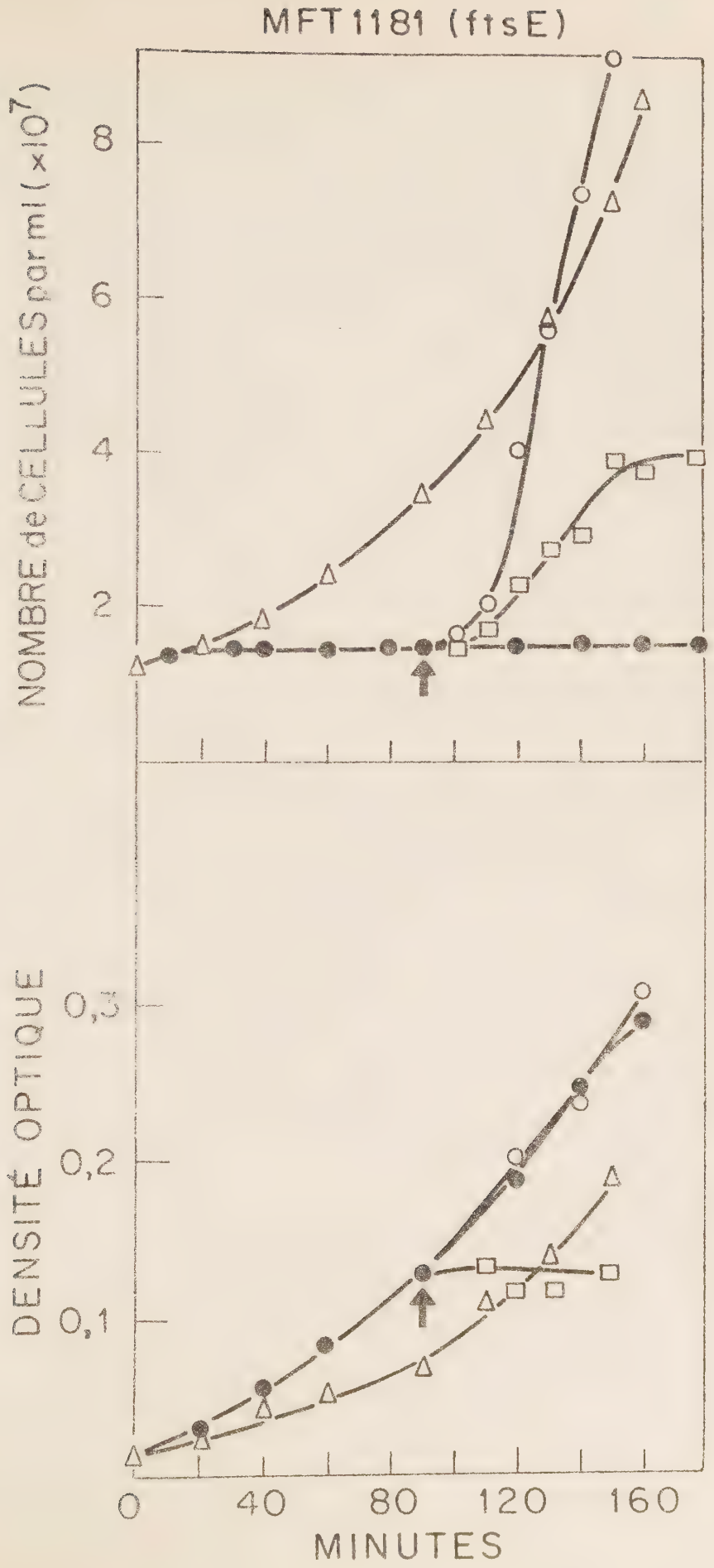

PAT 84 (fts A)
PA 3092
PAT 84 (fts A)
NOMBRE de CELLULES par ml (×10^8)
DENSITÉ OPTIQUE
MINUTES
3,2
2,4
1,6
0,8
2,8
2,0
1,2
0,4
0,7
0,5
0,3
0,1
0
60
120
180
0
60
120
180


MFT84 (ftsB)
NOMBRE de CELLULES par ml (×10⁷)
8
6
4
2
0,4
DENSITE OPTIQUE
0,3
0,2
0,1
0
40
80
120
160
200
MINUTES


MFT108 (ftsC)
CRT 115 (fts G)
NOMBRE de CELLULES par ml (×10⁷)
2
4
6
8
0
40
80
120
160
200
MINUTES


RCB 6 - MT 1302 (ftsD)
NOMBRE de CELLULES par ml (×10⁷)
8
6
4
2
0
0,4
DENSITE OPTIQUE
0,3
0,2
0,1
0
−20
t₀
40
80
120
160
190
MINUTES


MFT 1141 (fts F)
NOMBRE de CELLULES par ml (×10⁷)
8
6
4
2
DENSITÉ OPTIQUE
0,4
0,3
0,2
0,1
0
40
80
120
160
200
MINUTES


MFT 1181 (ftsE)
NOMBRE de CELLULES par ml (×10⁷)
8
6
4
2
DENSITÉ OPTIQUE
0,3
0,2
0,1
0
40
80
120
160
MINUTES

protéiques. Nous allons maintenant examiner les relations entre ce processus et la synthèse du DNA.

Nous avons vu, au cours de l'Introduction qu'un évènement qui se produit vers la fin du cycle de réplication du chromosome était nécessaire à l'expression de la division cellulaire (Clark, I968 ; Helmstetter et Pierrucci, I968). Par conséquent, si l'on inhibe la synthèse du DNA dans une population de cellules asynchrones, on observe toujours une augmentation résiduelle du nombre cellulaire qui provient de la division des cellules ayant achevé un cycle de réplication.

Ceci nous a conduit à examiner si les filaments multinucléés formés à 41° par une culture du mutant PAT84, qui peut être assimilée à une culture asynchrone, étaient capables de se diviser lorsqu'on inhibe la synthèse du DNA au moment où l'on abaisse la température à 30°.

De fait le Tableau 19 et la fig. 13 montrent que l'arrêt de la synthèse du DNA par des concentrations suffisamment élevées d'acide nalidixique ou de mitomycine C n'empêche pas la restauration de la division cellulaire à 30°.

On sait que de faibles concentrations d'inhibiteurs, IO γ /ml pour l'acide nalidixique (Goss, Deitz et Cook, I964 et 1γ /ml pour la mitomycine (Shiba, Terawaki, Taguchi et Kawamata, I959 ; Iyer et Szybalski I963)

suffisent normalement pour arrêter spécifiquement la synthèse du DNA chez E.coli. En revanche, dans le cas présent, il est apparu que l'usage de concentrations beaucoup plus élevées (1000 γ /ml d'acide nalidixique et 200 γ /ml de mitomycine) étaient nécessaires pour inhiber la synthèse du DNA chez les filaments de PAT84 ramenés de 41 à 30° (fig.13). Dans ces conditions, la croissance cellulaire est également affectée (Tableau 19).

Nous ne connaissons pas d'explication à ce phénomène qui n'a pas été étudié en dehors des expériences décrites ci-dessus. Il serait intéressant d'examiner si d'autres types de mutants filamenteux sont également résistants à ces composés et si cette résistance se manifeste au niveau cytoplasmique ou au niveau des barrières de perméabilité.

Nous allons maintenant passer en revue quelques résultats qui concernent les propriétés de l'enveloppe cellulaire, enveloppe qui comprend la membrane cytoplasmique, la macromolécule de muréine qui entoure toute la cellule (paroi) et la membrane externe (Henning et Schwarz I972).

TABLEAU 19

Une culture de la souche PAT84 est préincubée 120' à 41°. Des échantillons sont ensuite ramenés à 30° et le nombre de cellules est mesuré après 55 minutes (t = 175'). On a examiné l'effet de divers inhibiteurs de la synthèse du DNA (acide nalidixique et mitomycine C, voir fig. 13) sur la restauration de la division cellulaire (les nombres de cellules sont mesurés à l'aide d'un Coulter Counter) et sur la croissance (D.O. à 550 mμ dans des cuves de 0,5 cm de trajet optique).

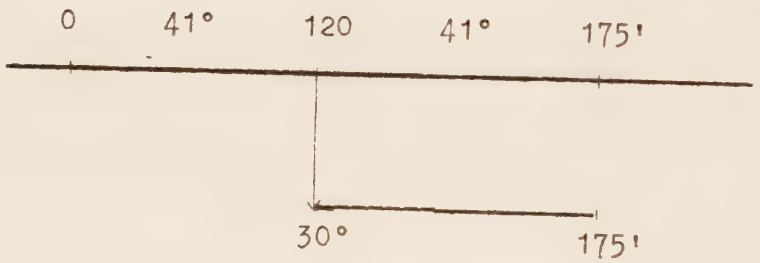


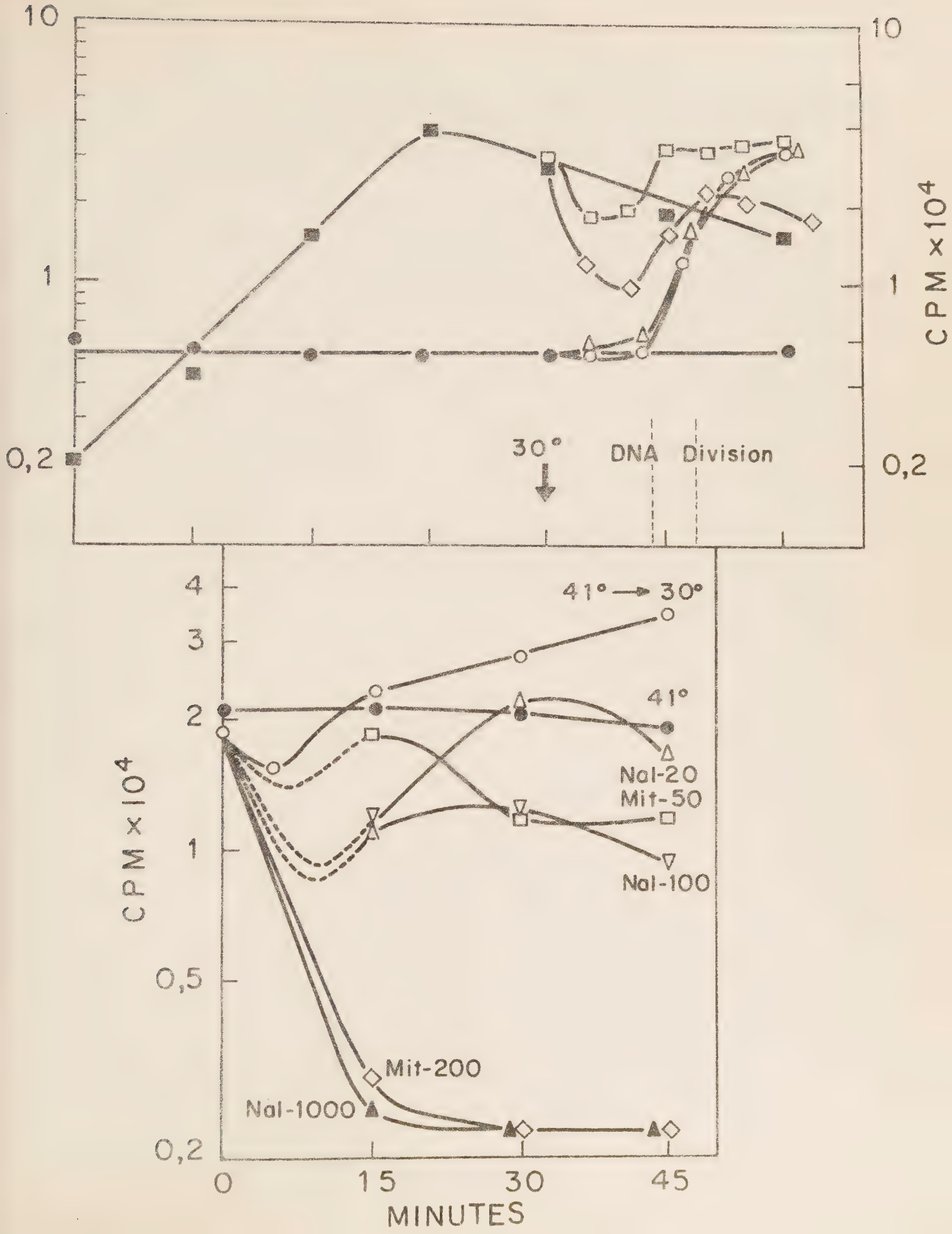
Tableau 19

T	t'	addition	nombre de cellules	densité optique
41°	120	-	6.000	0,25
41°	175	-	6.700	0.43
41° → 30°	175	-	24.500	0,415
41° → 30°	175	A.Nal 10 γ/ml	26.000	0,415
41° → 30°	175	A.Nal 1000 γ/ml	13.600	0,26
41° → 30°	175	mitomycine 200 γ/ml	18.000	0,35

Fig. 13. Après deux heures de préincubation à 41°, les cellules filamenteuses de PAT84 sont ramenées à 30° tandis que des agents inhibiteurs de la synthèse du DNA sont éventuellement ajoutés au même moment.
On mesure d'une part le taux d'incorporation de la thymidine ^{3}H au cours de marquages brefs (4') et d'autre part le nombre de cellules par ml de culture (à l'aide d'un coulter-counter).

Fig. du haut : nombre de cellules et incorporation radioactive à 41° (o—o, □—□), dans la culture ramenée à 30° au moment↑ , avec (Δ—Δ, ◇—◇) ou sans (o—o, □—□) addition simultanée d'acide nalidixique à 10 /ml final. L'intervalle de 10 min. qui sépare les restaurations de la synthèse du DNA et de la division cellulaire a été indiqué par des repères.

Fig. du bas : incorporation de thymidine ^{3}H au cours de marquages brefs (4') chez des cellules filamenteuses préincubées deux heures à 41° puis ramenées à 30° au temps zéro.
- en l'absence d'inhibiteur de la synthèse du DNA o—o
- en présence d'inhibiteurs Δ—Δ (acide nalidixique à 50γ/ml final)
▽—▽ (" " 100γ/ml ")
▲—▲ (" " 1000γ/ml ")
□—□ (mitomycine C à 50γ/ml final)
◇—◇ (" 200γ/ml ")
- culture conservée à 41° en l'absence d'inhibiteur ●—●


10
1
0,2
CPM x 10⁴
30°
DNA
Division
41° → 30°
41°
Nal-20
Mit-50
Nal-100
Mit-200
Nal-1000
4
3
2
0,5
0
15
30
45
MINUTES

6) Mesure de la variation de fluorescence après addition d'acide 1-anilino-8-naphtalène sulfonique (ANS).

Cette mesure peut, dans certains cas, permettre l'identification de mutants de membrane.

C'est ainsi que, chez le mutant CRT257, qui présente des anomalies marquées au niveau de la membrane cytoplasmique (Hirota, Wakil, Shapiro, Ryter, Hurwitz et Jacob, 1970), l'addition d'ANS à une suspension bactérienne lavée (cf. Matériel et Méthodes) provoque un accroissement de fluorescence 40 fois supérieur à celui qui est observé dans les mêmes conditions chez la souche sauvage. Un phénomène similaire a été observé chez un mutant de DNA dont certaines protéines membranaires sont modifiées (Hirota, Mordoh et Jacob, 1970).

Ces observations nous ont donc conduit à examiner l'effet de l'ANS sur une série de mutants de division. Le tableau 26 montre qu'il n'existe aucune différence significative entre les résultats obtenus avec la souche parentale et avec les mutants cultivés à 30° ou à 41°.

L'ANS produit une légère fluorescence en solution pure dans l'eau et une fluorescence intense dans une solution de protéines en se fixant sur les groupes hydrophobes de ces dernières (Weber et Young, 1964). Si des modifications de la membrane existaient chez les mutants

examinés, elles n'entraineraient donc pas une plus grande accessibilité de l'ANS à des sites hydrophobes normalement masqués chez la souche parentale.

7) Sensibilité à l'égard du déoxycholate de sodium.

Certains mutants qui présentent des altérations de la membrane cytoplasmique ont une sensibilité accrue à l'égard du déoxycholate de sodium (Nagel de Zwaig et Luria, 1967 ; Hirota, Wakil et col., 1970 ; Ricard et Hirota, 1970; Henning, Rehn, Braun et Höhn, 1970).

Dans le cas présent, nous avons examiné sur boîte de Pétri (cf. Matériel et Méthodes, p. 3) la sensibilité des mutants MFT1 (ftsA) , MFT84 (ftsB), MFT108 (ftsC), MFT1111 (ftsD), MFT 1181 (ftsE), MFT 109 (ftsA) et MFT110 (parA). Il est ressorti de cet examen qu'aucune de ces souches ne possédait une sensibilité supérieure à celle du type parental.

8) Analyse des protéines membranaires.

L'analyse comparée par électrophorèse sur gel d'acrylamide des protéines de la membrane cytoplasmique du mutant PAT84 (ftsA) et de la souche parentale (PA 3092) n'a révélé aucune différence significative (B. Shapiro, communication personnelle).

9) Effet de la pénicilline sur les mutants de type fts.

On sait que la pénicilline G a deux effets morphologiquement distincts sur E.coli (Starka et Morarova, 1967 ; Schwarz, Asmus et Franck, 1969 ; Hartmann, Höltje et Schwarz, 1972). A faible concentration (20 U/ml), la pénicilline inhibe la division cellulaire sans arrêter la croissance, ce qui donne lieu à la formation de cellules filamenteuses. Lorsque la concentration dépasse 100 U/ml, elle affecte également la croissance et provoque la lyse des cellules.

Deux enzymes au moins servent de cible à l'action de la pénicilline (Hartmann et col., 1972). Ce sont toutes deux des hydrolases de la muréine de la paroi : une endopeptidase qui est inhibée in vitro par de faibles concentrations de pénicilline et une glucosidase qui est inhibée in vitro également par des concentrations plus élevées.

Considérant les relations existant entre l'action de la pénicilline, la paroi cellulaire et la division, il semblait donc intéressant de comparer les effets de la pénicilline G sur divers mutants incapables de se diviser et sur la souche parentale. Pour cela, des concentrations croissantes de pénicilline (0,50, 100 et 200 U/ml) ont été ajoutées à une culture en croissance exponentielle à 30° et divers échantillons ont été ensuite incubés à

30 ou 41°. La croissance et la lyse des cellules ont été suivies au cours du temps par la mesure de la densité optique et l'examen de la morphologie cellulaire au microscope à contraste de phase.

Ces expériences ont révélé l'existence de différences très nettes entre les souches appartenant aux divers locus fts. En effet, les mutants des classes ftsA, ftsB, ftsD, ftsF, ftsG, sont significativement plus résistants à la pénicilline G que ne l'est la souche parentale (fig. 14 à 17). En revanche, les mutants des classes ftsC et ftsE présentent une sensibilité normale (fig. 16 et 17).

Si l'on introduit par transduction une mutation ftsA (l'expérience a été tentée avec les mutations ftsA des souches PAT84 et MFTII82) dans une souche ayant une constitution génétique différente, on constate que la résistance à la pénicilline ne peut être dissociée du caractère fts (fig.I5). Ce phénomène semble donc spécifique des diverses mutations considérées.

La pénicilline agit au niveau de la muréine (voir précédemment) qui est une macromolécule de structure complexe. Il est raisonnable de penser que son action ne peut s'exercer que dans certaines conditions définies et que des modifications de l'enveloppe cellulaire (modifications de composition chimique, de structure spatiale, etc..) seraient alors susceptibles d'empêcher cette action. Les

mutations de type ftsA, B, D, F et G à la différence des mutations ftsC et E, pourraient donc engendrer des modifications de ce genre, directement ou indirectement.

Il est également intéressant de noter que les souches résistantes à la pénicilline sont généralement résistantes aussi bien à 30°qu'à 41°. Dans la plupart des cas, on sait que ce sont les protéines fts elles-mêmes, et non pas leurs synthèses, qui sont thermosensibles (ceci est démontré par les expériences de restauration de la division en présence de chloramphénicol, p. 44) . La séquence primaire de ces protéines est donc déjà modifiée à 30°. Ces modifications pourraient être suffisantes pour provoquer le phénomène de résistance à la pénicilline, sans pour autant inhiber la division.

Notons, à ce propos, que les propriétés des mutants ftsC et ftsE montrent que l'arrêt de la division cellulaire n'est pas en lui-même la cause de la résistance à la pénicilline.

Dans tous les cas, le phénomène permet d'établir un rapprochement entre les effets des mutations de type ftsA, B, D, F et G et donc des fonctions que ces gènes gouvernent.

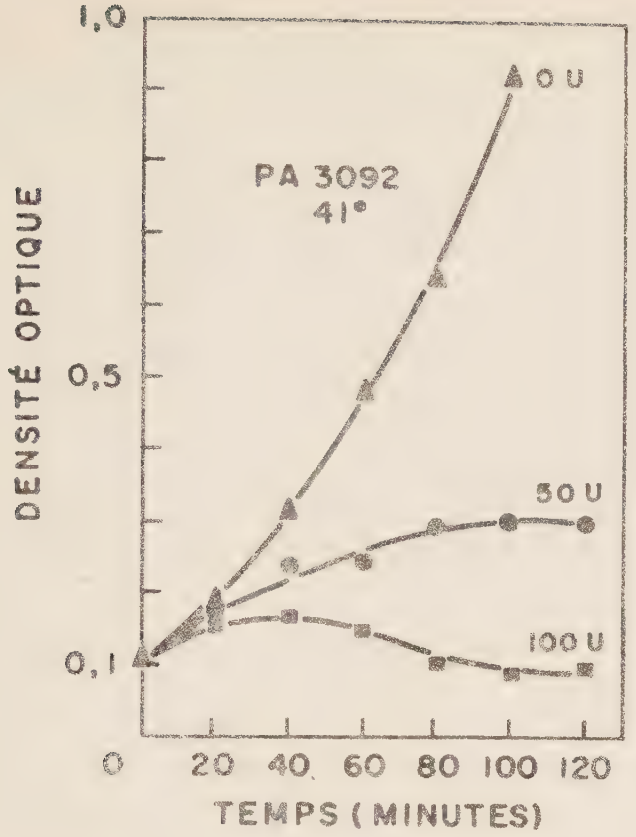
L'identification de deux enzymes sensibles à l'action de la pénicilline G (Hartmann et col. 1972) peut permettre d'étudier biochimiquement ce phénomène.

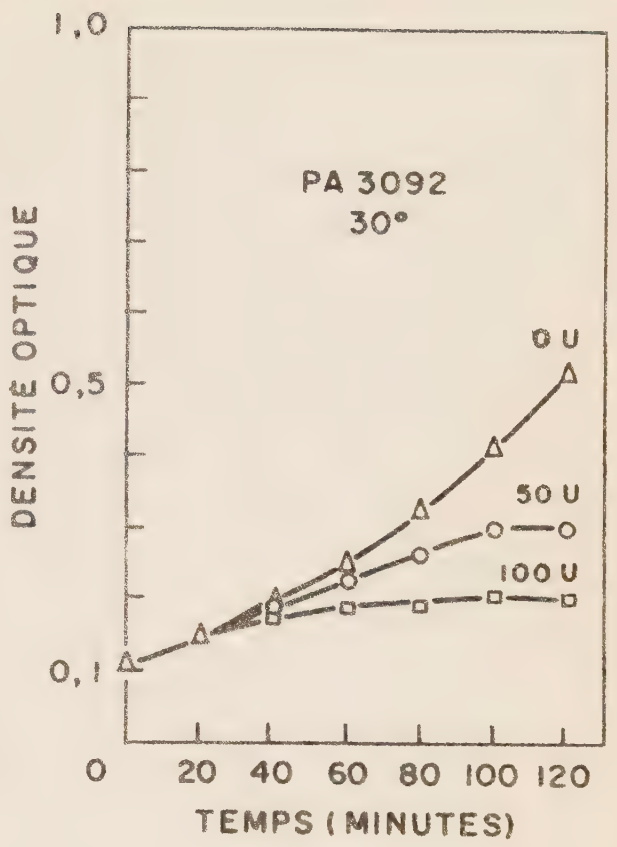
Fig. 14. La croissance et la lyse des cellules à 30° et à 41° (milieu ML) en présence ou en absence de Pénicilline sont estimées en mesurant les densités optiques des cultures (absorption à 550 mμ dans des cuves de 1 cm de trajet optique).

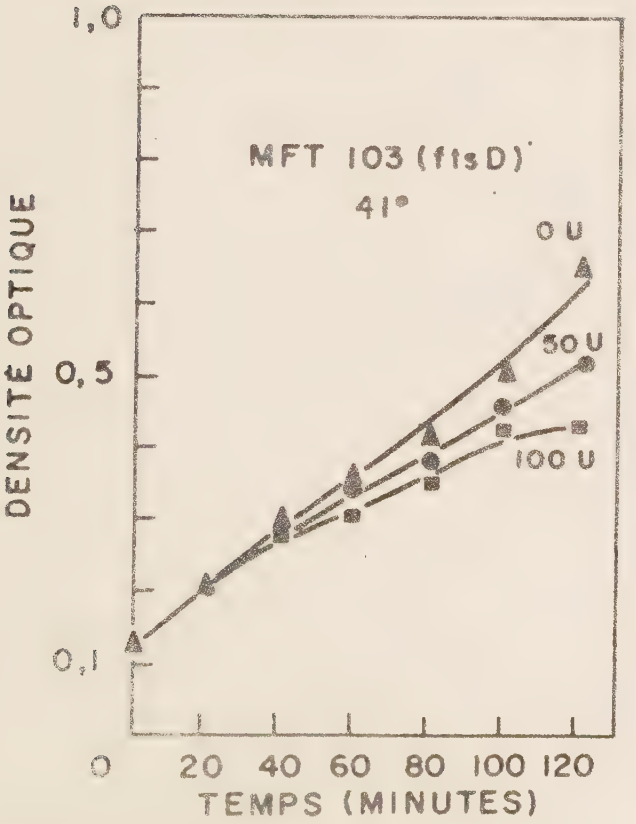
En l'absence de Pénicilline, à 30° (Δ—Δ) et à 41° (▲—▲)

En présence de 50 unités internationales de Pénicilline G à 30° (o—o) et à 41° (●—●)

En présence de 100 unités internationales de Pénicilline G à 30° (□—□) et à 41° (■—■).


1,0
0,5
0,1
0
DENSITÉ OPTIQUE
PA 3092
41°
0 U
50 U
100 U
20 40 60 80 100 120
TEMPS (MINUTES)


1,0
0,5
0,1
0
DENSITÉ OPTIQUE
PA 3092
30°
0 U
50 U
100 U
20 40 60 80 100 120
TEMPS (MINUTES)


1,0
0,5
0,1
0
DENSITÉ OPTIQUE
MFT 103 (ftsD)
41°
0 U
50 U
100 U
20 40 60 80 100 120
TEMPS (MINUTES)

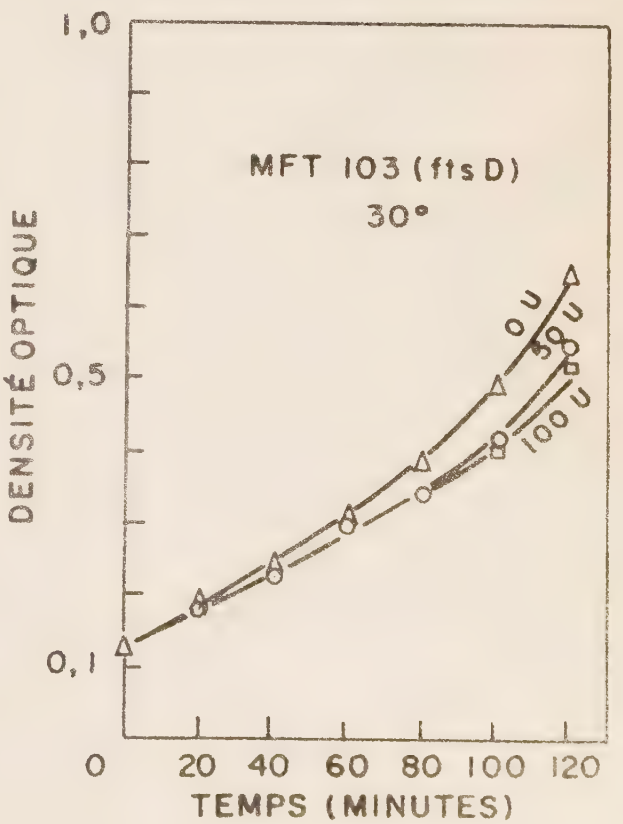

1,0
0,5
0,1
0
DENSITÉ OPTIQUE
MFT 103 (ftsD)
30°
0 U
50 U
100 U
20 40 60 80 100 120
TEMPS (MINUTES)

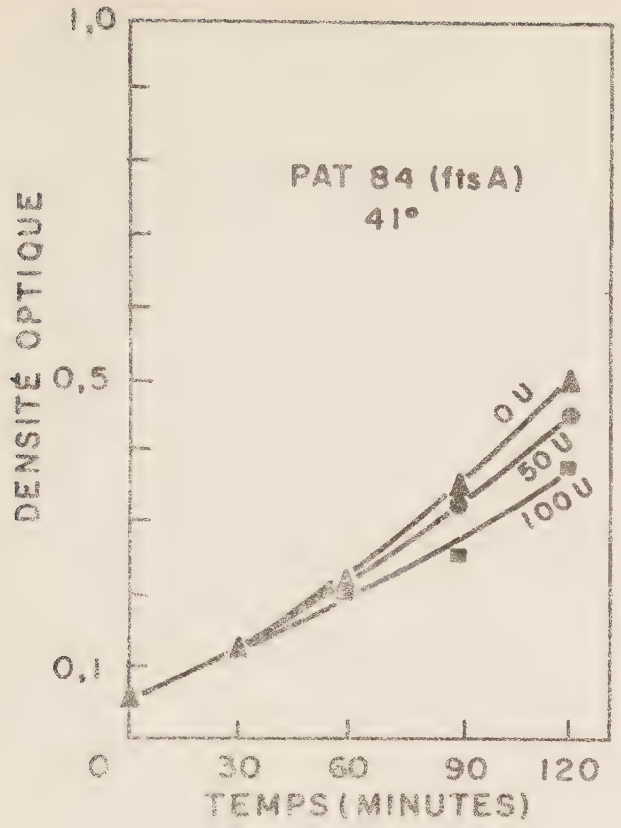
Fig 15 et 16 La croissance et la lyse des cellules à 30° et à 41° (milieu ML) en présence ou en absence de Pénicilline sont estimées en mesurant les densités optiques des cultures (absorption à 550 mμ dans des cuves de 1 cm de trajet optique)

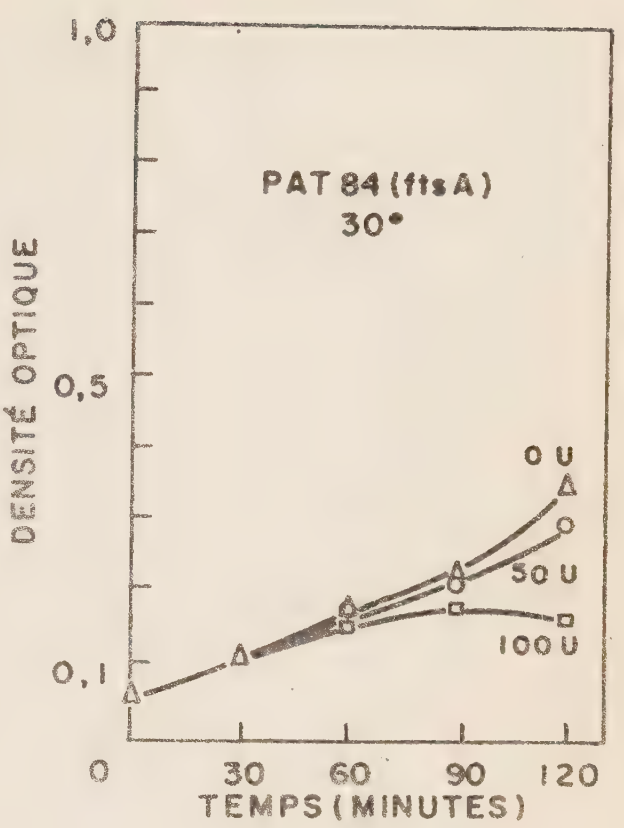
En l'absence de Pénicilline, à 30° (Δ—Δ) et à 41° (▲—▲)

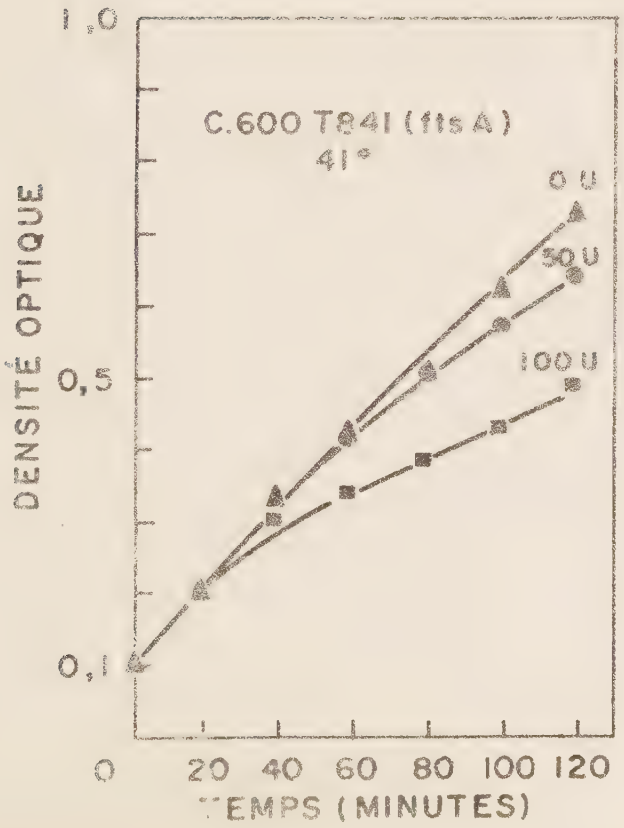
En présence de 50 unités internationales de Pénicilline G à 30° (o—o) et à 41° (●—●)

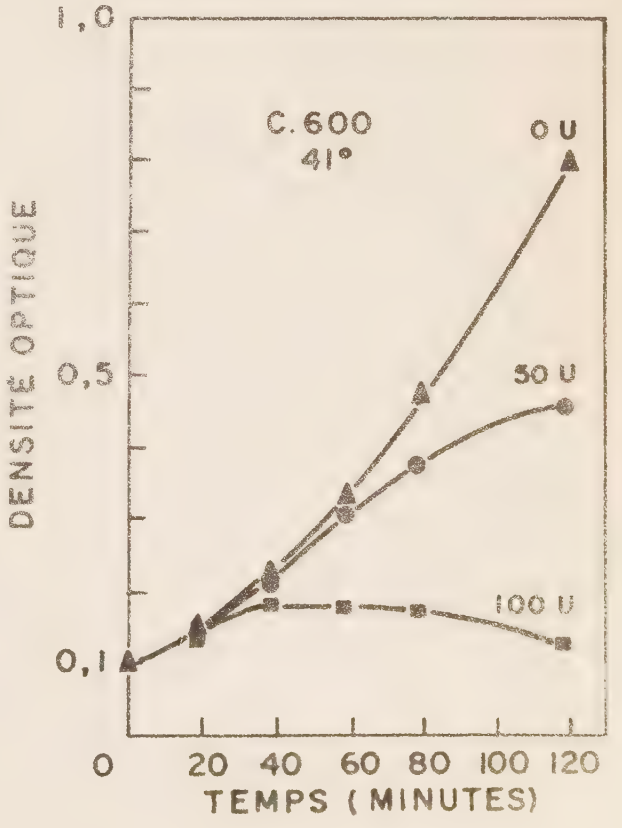
En présence de 100 unités internationales de Pénicilline G à 30° (□—□) et à 41° (■—■)

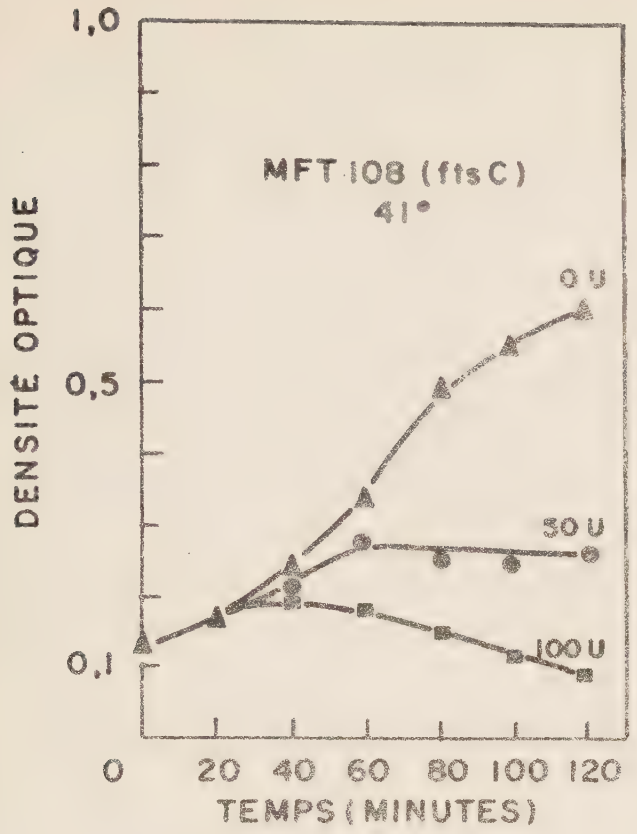
La souche C-600 T341 est une souche de type C-600 qui a reçu l'allèle ftsA de la souche PAT84 par transduction à l'aide du phage P_1

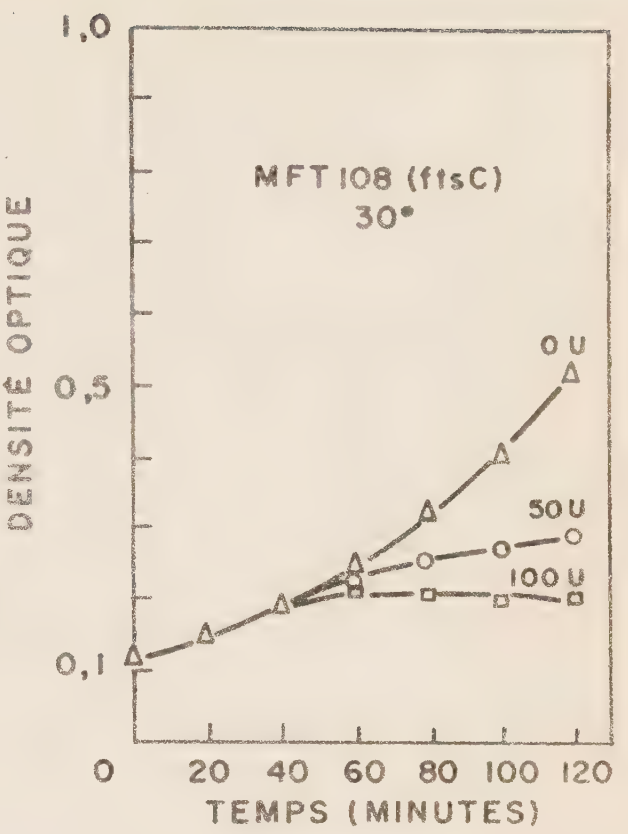

PAT 84 (ftsA)
41°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
0 U
50 U
100 U
30
60
90
120
TEMPS (MINUTES)

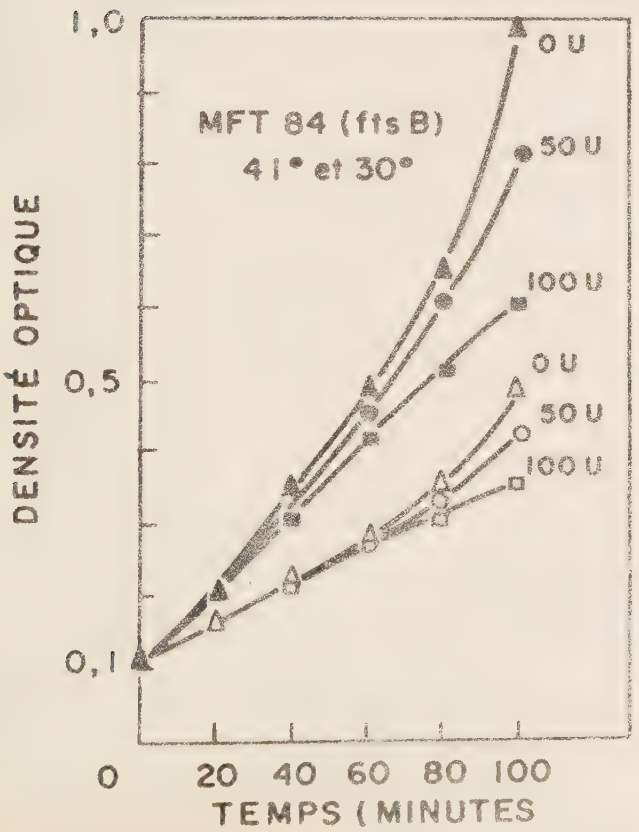

PAT 84 (ftsA)
30°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
0 U
50 U
100 U
30
60
90
120
TEMPS (MINUTES)


C.600 T841 (ftsA)
41°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
0 U
50 U
100 U
20
40
60
80
100
120
TEMPS (MINUTES)


C.600
41°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
0 U
50 U
100 U
20
40
60
80
100
120
TEMPS (MINUTES)


MFT 108 (ftsC)
41°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
0 U
50 U
100 U
20 40 60 80 100 120
TEMPS (MINUTES)


MFT 108 (ftsC)
30°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
0 U
50 U
100 U
20 40 60 80 100 120
TEMPS (MINUTES)


MFT 84 (ftsB)
41° et 30°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
0 U
50 U
100 U
0 U
50 U
100 U
20 40 60 80 100
TEMPS (MINUTES

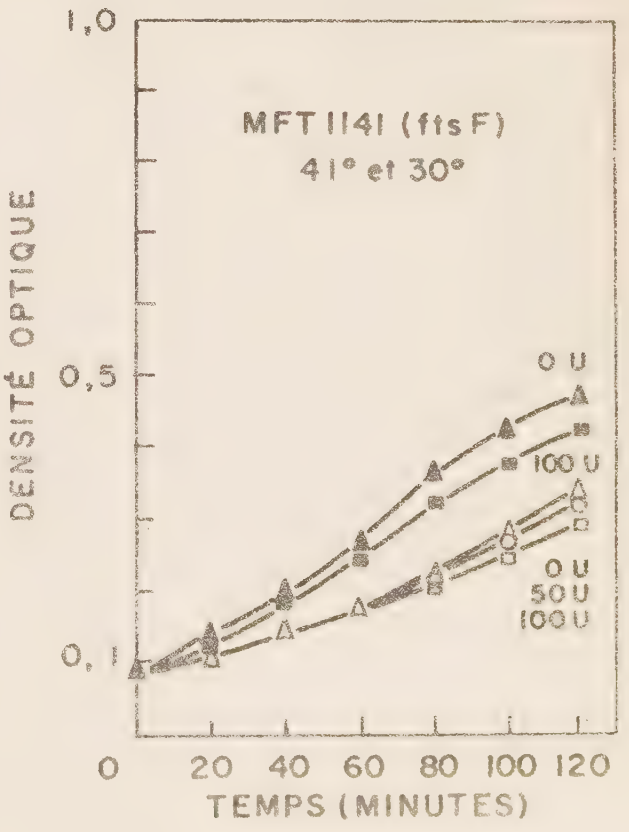

MFT 1141 (ftsF)
41° et 30°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
0 U
100 U
0 U
50 U
100 U
20 40 60 80 100 120
TEMPS (MINUTES)

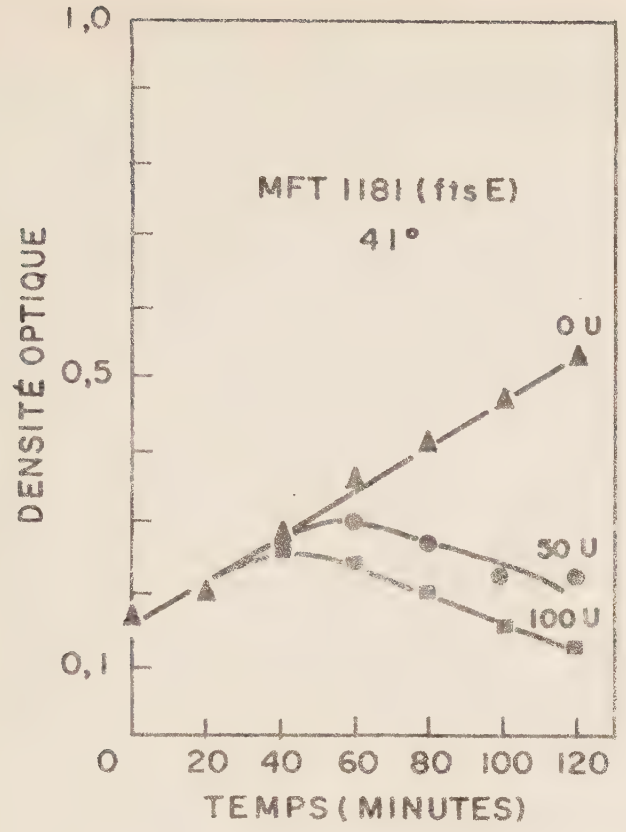
Fig. 17. La croissance et la lyse des cellules à 30° et à 41° (en milieu ML), en présence ou en absence de Pénicilline, sont estimees en mesurant les densités optiques des cultures (absorption à 550 mμ dans des cuves de 1 cm de trajet optique).

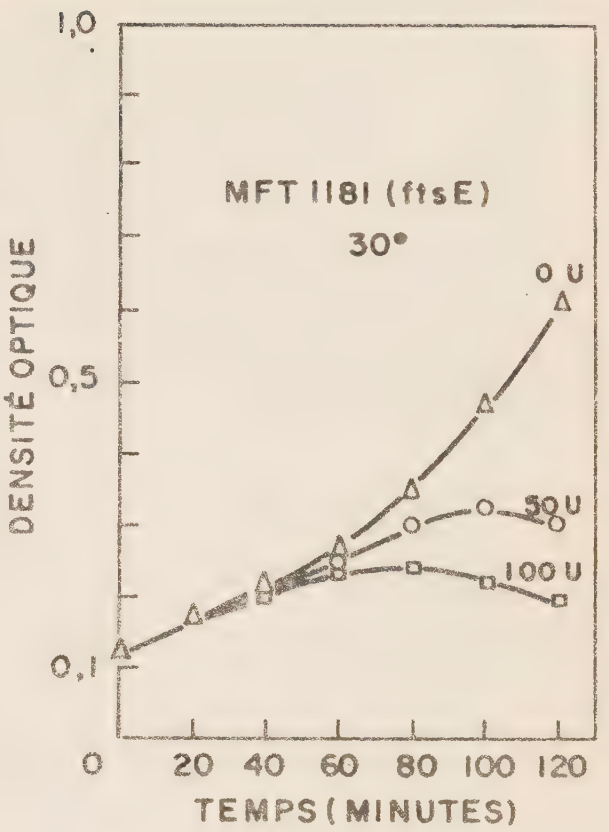
En l'absence de Pénicilline, à 30° (Δ—Δ) et à 41° (▲—▲)

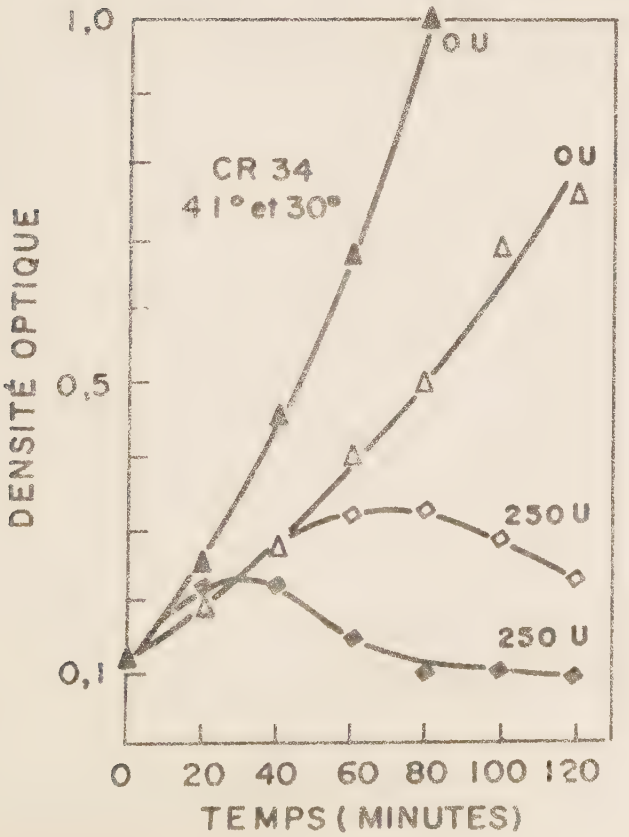
En présence de 50 unités internationales de Pénicilline G, à 30° (o—o) et à 41° (●—●)

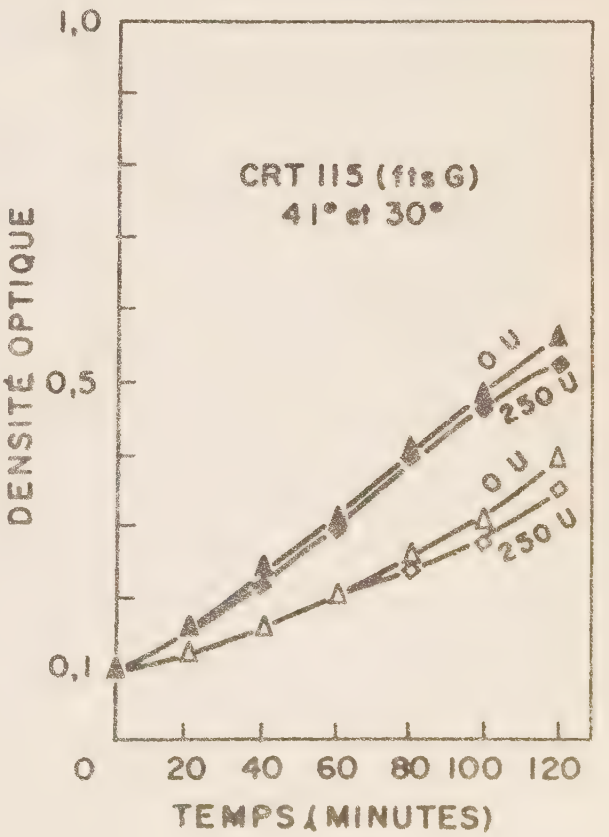
En présence de 100 unités internationales de Pénicilline G, à 30° (□—□) et à 41° (■—■)

En présence de 250 unités internationales de Pénicilline G, à 30° (◇—◇) et à 41° (◆—◆)


MFT 1181 (ftsE)
41°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
20 40 60 80 100 120
TEMPS (MINUTES)
0 U
50 U
100 U


MFT 1181 (ftsE)
30°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
20 40 60 80 100 120
TEMPS (MINUTES)
0 U
50 U
100 U


CR 34
41° et 30°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
20 40 60 80 100 120
TEMPS (MINUTES)
0 U
0 U
250 U
250 U


CRT 115 (ftsG)
41° et 30°
DENSITÉ OPTIQUE
1,0
0,5
0,1
0
20 40 60 80 100 120
TEMPS (MINUTES)
0 U
250 U
0 U
250 U

10) Examen d'enzymes de la paroi cellulaire.

En collaboration avec les Drs U. Schwarz et Van Heigenort il a été entrepris de mesurer chez nos mutants les activités d'un certain nombre d'enzymes qui exercent une action hydrolytique sur la muréine de la paroi cellulaire.

Deux types d'activité peuvent être mesurés : une activité glucosidasique qui reflète l'action de glucosidases sur les chaînes polysaccharidiques de la muréine, et une activité endopeptidasique qui reflète l'action d'endopeptidase sur les ponts peptidiques qui relient les chaînes polysaccharidiques. Ces activités sont estimées en mesurant le passage de la radioactivité des précurseurs marqués de la paroi, sous forme TCA-soluble, et en identifiant les produits de la réaction par chromatographie sur papier.

Ces activités glucosidasiques et endopeptidasiques ont été mesurées chez un représentant de chaque classe mutée (fts A à G) et aucune différence significative n'a été notée par rapport au type sauvage. Toutefois, ces activités reflétaient l'action de plusieurs enzymes ayant des effets similaires sur les substrats utilisés.

De nouvelles expériences sont en cours qui permettent de mesurer les activités d'enzymes purifiés à partir de la souche sauvage et des mutants. Des résultats prélimi-

naires semblent indiquer que dans un cas, celui du mutant de type ftsC (MFTI08), l'une des endopeptidases de la muréine serait thermosensible et serait donc l'un des enzymes intervenant dans le clivage de la cellule.

II) Formation de cellules filamenteuses par les doubles mutants de type fts-rec.

Green, Greenberg et Donch (1969) ont montré que la mutation recA supprimait la formation de cellules filamenteuses consécutives à l'irradiation d'un mutant de type lon par les rayons ultra-violets. Par ailleurs, Inouye (1971) a observé que la présence d'une mutation recA chez une souche thy permettait aux filaments formés à la suite d'une carence en thymine de se diviser aux deux extrémités. Des cellules dépourvues de DNA sont ainsi produites. D'après cet auteur, le gène recA$^+$ exercerait donc un contrôle négatif sur la division cellulaire.

Nous avons construit une série de doubles mutants qui portent une mutation recA ou recB en plus d'une mutation thermosensible (MFTI-recA, MFT96- recA, MFT1182-recA, PAT84-recA, PAT84-recB, MFT84-recA, MFTI08-recA, MFTI03-recA, MFT1111-recA, MFTII81-recA, MFT99-recA, MFT123-recA, MFT1141-recA, MFT 123-recA, MFTII0-recA, MFTII0-recB, MFTI00-recA).

Dans tous les cas, nous avons trouvé que les souches ainsi obtenues demeuraient thermosensibles et formaient des filaments à 41° de la même façon que les souches rec$^+$ dont elles proviennent. L'exemple illustré par la fig.I8 montre que le mutant PAT843 (ftsA-recA) cesse immédiatement de se diviser à 41°, tout en restant capable de se diviser à nouveau à 30° après deux heures de préincubation à haute température. Il se comporte en cela de la même manière que la souche d'origine, PAT84 (fig. 7).

On peut donc conclure de ces expériences que, si la fonction recA$^+$ exerce un contrôle négatif sur la division, ce n'est pas elle qui inhibe la division des souches portant une mutation fts (de ftsA à ftsG)

12) Induction de la multiplication du prophage chez les cellules filamenteuses.

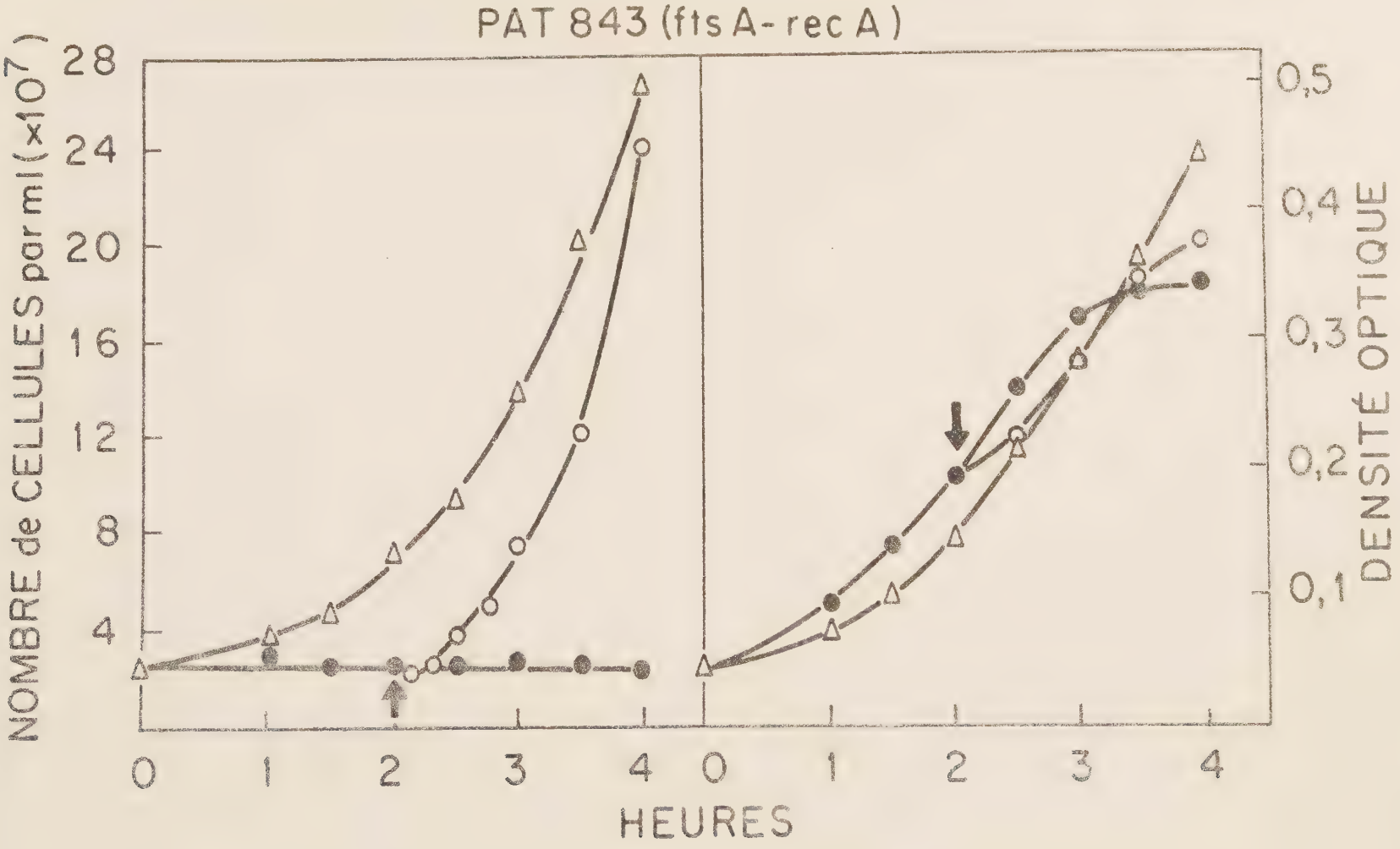
Kirby, Jacob et Goldthwait (1967) ont décrit un mutant thermosensible, C-600-T44, qui à l'état lysogène induit la multiplication du prophage λ à haute température et qui forme des filaments en l'absence de prophage. Castellazi, George et Buttin (manuscrit en préparation) ont montré que ce phénotype était dû à une simple mutation localisée sur le chromosome d'E.coli, à proximité du locus recA ; Kirby et col. ont également montré que si l'induction du prophage λ et de la formation des filaments semblaient liées (voir

Fig. 18. Cinétique de division cellulaire d'un double mutant de type ftsA recA.

Des filaments sont formés à 41° (●—●), tandis que la culture témoin gardée à 30° croit et se divise normalement (Δ—Δ) (milieu ML).

Lorsqu'au temps 2hrs (↑), on remet à 30° un échantillon de cellules filamenteuses, on observe une restauration de la division cellulaire (o—o).

Les dénombrements cellulaires sont réalisés à l'aide d'un coulter-counter, et les densités optiques sont estimées par l'absorption à 550 mμ dans une cuve de 0,5 cm de trajet optique.


PAT 843 (fts A- rec A)
NOMBRE de CELLULES par ml (×10⁷)
28
24
20
16
12
8
4
0
1
2
3
4
0
1
2
3
4
HEURES
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
DENSITÉ OPTIQUE

également Witkin, I967 ; Green, Greenberg et Donch, I969), ceci n'impliquait nullement que l'arrêt de la division cellulaire puisse être par elle-même la cause de l'induction du prophage. De fait, il est possible, à l'aide de faibles doses de pénicilline ou de cristal violet, d'induire la formation de filaments chez diverses souches lysogènes, dont le mutant C-600 T44 (λ), sans induire pour autant la multiplication du prophage.

Nos expériences confirment ce dernier point. Ayant rendu la plupart de nos souches lysogènes pour le phage λ - L26 (qui est capable de s'adsorber sur les souches malA/λR), nous avons constaté que toutes formaient des cellules filamenteuses à 41°, sans induire la multiplication du prophage λ .

C'est ainsi que les souches MFT33 (λ), MFT96 (λ) , MFT109 (λ), MFT1182 (λ) , toutes quatre ftsA ; MFT108 (λ), ftsC ; MFT1111 (λ) , ftsD , MFT1181 (λ), MFT99 (λ), et MFT123 (λ), ftsE ; MFT1141 (λ), ftsF ; MFT29 (λ) et CRT115 (λ), ftsG ; MFT110 (λ), parA ; MFT100 (λ), parB, ainsi que leurs parents respectifs non lysogènes ont été cultivés à 41° ; dans tous les cas, l'accroissement de la masse cellulaire pendant 2,5 heures à 41° (accroissement estimé d'après la densité optique de la culture) est le même chez les souches lysogènes et chez les souches nor lysogènes. Dans certains cas, il a été vérifié que le

nombre des particules phagiques libérées par ces souches lysogènes ne différaient pas significativement à 30° et à 41°.

Rappelons que dans le cas du mutant C-600 T44 (λ), la lyse des cellules se manifeste après 60 min. d'incubation à 41° par la décroissance rapide de la densité optique de la culture et par l'apparition d'environ 100 particules phagiques libres par cellule.

°

L'étude physiologique et biochimique que nous avons entreprise avec des mutants de type fts aura permis, sinon d'en identifier la nature, du moins de progresser dans cette direction en dégageant les caractéristiques principales de ces mutants et en les comparant entre elles.

Le tableau 20 montre en effet; lorsque l'on considère les divers points examinés, que chaque classe mutée présente un ensemble unique de caractères.

La variété de ces résultats reflète donc la variété des fonctions qui sont impliquées dans la septation.

C'est le cas notamment des résultats des expériences de restauration de la division cellulaire après une période de préincubation à 41°. Il est intéressant de noter à ce

propos que le seul type de mutant(ftsD)qui requiert des synthèses protéiques de novo pour pouvoir se diviser à nouveau à 30°, est également le seul type dont les mutations soient dominantes par rapport à l'allèle sauvage. Quelques hypothèses ont été proposées à ce sujet (p. 33).

Pour autant que l'on puisse en juger, les mutants de type fts ne présentent pas d'altérations de la membrane cytoplasmique comparables à celles qui ont été observées chez le mutant CRT46 (dnaA, Hirota, Mordoh et Jacob. 1970) et chez divers mutants de membrane (cf.chapitre VII).

En revanche, les expériences réalisées avec la pénicilline G indiquent l'existence d'un rapport direct ou indirect entre les mutations ftsA, B, D, F et G et la paroi cellulaire.

Jacob, Brenner et Cuzin (1963) ont assigné à la membrane cytoplasmique un rôle régulateur dans divers processus de cycle cellulaire. La muréine de la paroi et la membrane cytoplasmique étant étroitement associées (Schwarz et Leutgeb 1971), c'est l'ensemble de l'enveloppe cellulaire qui pourrait, par le jeu d'interactions diverses, intervenir dans la régulation envisagée

o

TABLEAU 20

Principales caractéristiques des mutants

de types *fts* et *parB*

Tableau 20

Gène	Mutation	Localisation sur la carte chromosomique (Taylor, 1970)	Dominance ou récessivité	Synthèses macromol. (DNA, RNA, prot.)	Répartition des noyaux	Division cellulaire à 30° après 70' à 41° -CM	Division cellulaire à 30° après 70' à 41° +CM	Résistance à la pénicilline	Effet de recA sur la div. à 41° Ind. de λ à 41°
souche sauvage PA3092	+			+	+	+	0,+	-	-
ftsA	MT1 MT33 MT96 MT109 MT1182 T84	1-1,5'	Reces.	+	+	+	+	+	-
ftsB	MT84	29-30'	Reces.	+	±	0,+	0,+	+	-
ftsC	MT108	3-8'		+	±	0,+	0,+	-	-
ftsD	MT103 MT1111	77,5'	Dom.	+	+	+	0,+	+	-
ftsE	MT99 MT1181 MT123	66-69'	Reces.	+	+	+	+	-	-
ftsF	MT1141	73,5'		+	+	0,+	C,+	+	-
ftsG	MT29 T115	26-28'	Reces.	+	+	0,+	0,+	+	-
parB	MT100	56-60'	Reces.	+	-	+	+	-	-

0,+ = très réduit

B/ Etude du mutant MFTIOO (parB)

Nous avons vu précédemment (p. 19) que la mutation parB provoquait une inhibition de la séparation et de la répartition des chromosomes, ainsi qu'un arrêt de la division cellulaire. Le mutant MFTIOO est le seul mutant connu à ce locus parB.

Reprenant les principaux points analysés chez les mutants de type fts, nous pouvons résumer comme suit les caractéristiques physiologiques du mutant MFTIOO :

1) Lorsque cette souche est transférée de 30 à 41°, la division cellulaire cesse et la croissance se poursuivant pendant au moins 120 min. à un taux supérieur ou égal à celui que l'on observe à 30°, il se forme de longues cellules filamenteuses. Au cours d'une période d'incubation de I80 min., le nombre de cellules augmente de IO fois à 30°, tandis que l'augmentation résiduelle à 42 ou à 41 ne représente que 20 à 40% du nombre initial (fig.I9).

Lorsqu'on ramène à 30° des filaments formés après 50 min. de préincubation à 41°, on observe une restauration de la division cellulaire dont l'expression ne requiert pas de synthèses protéiques de novo (fig.I9). Cette restauration semble même plus rapide en présence qu'en l'absence de chloramphénicol. Dans ce cas, on observe dans la population

un pourcentage variable ce cellules nucléées. Il se pourrait donc que la restauration de la septation en présence de synthèses protéiques soit quelque peu ralentie par la restauration de la répartition des noyaux. En revanche, en l'absence de synthèses protéiques, l'élongation cellulaire étant arrêtée, seule la septation est susceptible d'être restaurée à basse température. On peut donc en conclure que l'inhibition de la division cellulaire à 41° peut être levée par l'expression de la fonction par à 30°, quand bien même la séparation physique des noyaux ne peut s'effectuer. Cette inhibition serait donc d'ordre biochimique et non pas d'ordre topologique.

2) Le taux de synthèse du DNA à haute température est légèrement réduit par rapport à l'accroissement de la masse cellulaire. Cette synthèse se poursuit néanmoins pendant au moins 3 heures à 41° (fig.I9).

3) Ce mutant est sensible à la pénicilline G au même degré que la souche parentale (fig.9).

4) L'addition d'acide I-anilino-8-naphtalène sulfonique (p. 52) à une suspension de cellules filamenteuses de MFTIOO en tampon phosphate, provoque une augmentation de fluorescence comparable à celle qui est observée avec le

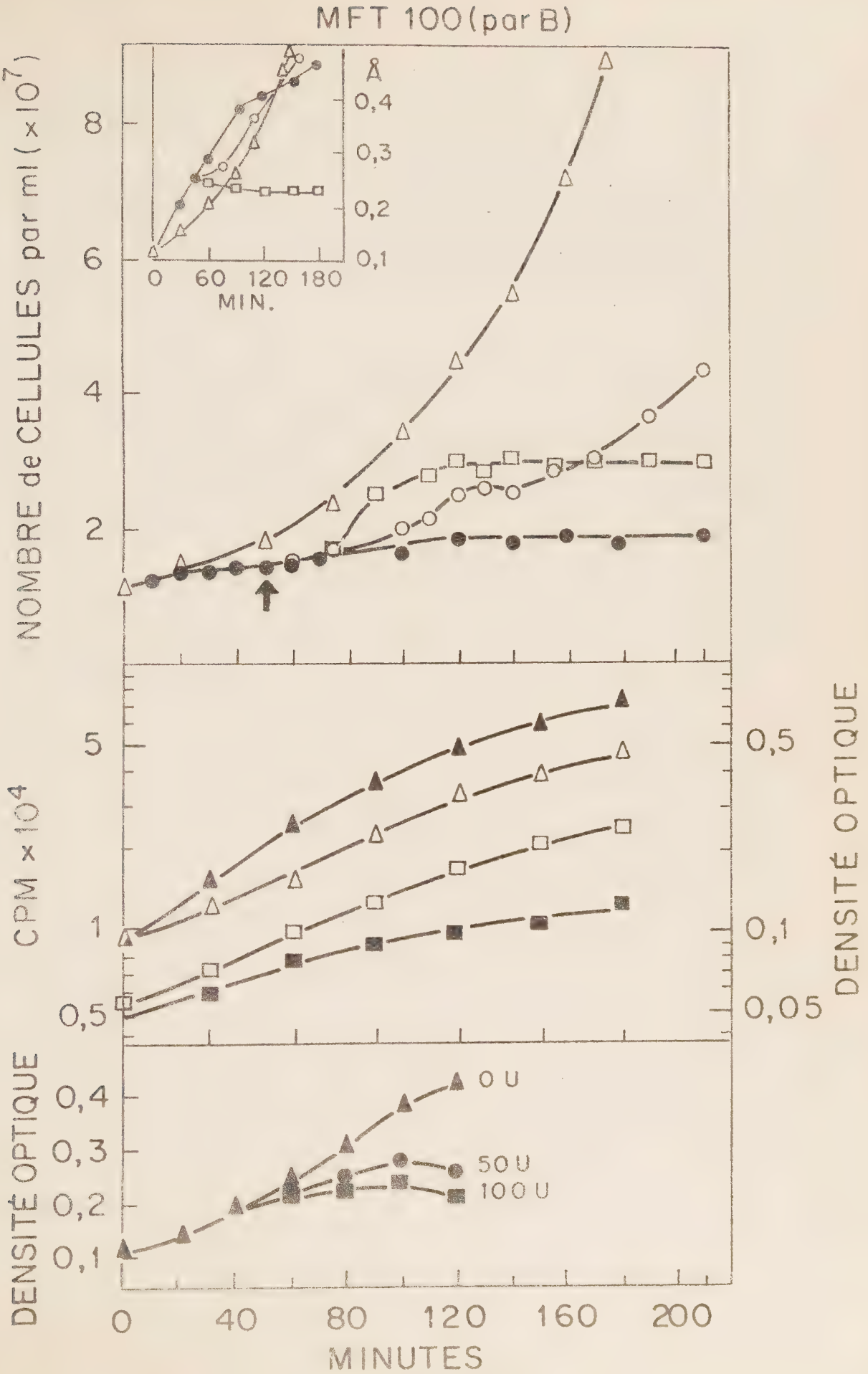
Fig. 19. Haut. Cinétique de division cellulaire

Après 50' d'incubation à 41° (●—●) des échantillons de cellules filamenteuses sont remis à croître à 30° avec (□—□) ou sans (o—o) addition de chloramphenicol (100γ/ml final) au moment (↑) de l'abaissement de la température. (milieu ML)

Une culture témoin est gardée à 30° tout au long de l'expérience (Δ—Δ). Les dénombrements cellulaires sont réalisés à l'aide d'un coulter-counter et les densités optiques des cultures sont mesurées à 550 mμ dans des cuves de 0,5 cm de trajet optique.

milieu. Sont ici représentées le taux d'incorporation de la thymidine ^{3}H au cours de marquages brefs (4'), à 30° (□—□) et à 41° (■—■) et l'évolution des densités optiques des cultures à 30° (Δ—Δ) et à 41° (▲—▲).

Bas. La croissance et la lyse des cellules à 41° (milieu ML) en présence (●—● 50 unités internationales par ml, ■—■ 100 unités internationales par ml) ou en l'absence (▲—▲) de pénicilline G sont estimées en mesurant les densités optiques des cultures.


MFT 100 (par B)
NOMBRE de CELLULES par ml (×10⁷)
Å
0,4
0,3
0,2
0,1
0 60 120 180
MIN.
8
6
4
2
CPM ×10⁴
5
1
0,5
0,5
0,1
0,05
DENSITÉ OPTIQUE
DENSITÉ OPTIQUE
0,4
0,3
0,2
0,1
0 U
50 U
100 U
0 40 80 120 160 200
MINUTES

type sauvage.

5)L'introduction de la mutation recA chez ce mutant ne modifie ni la thermosensibilité, ni la propriété de former des filaments à 41°.

6) La souche MFT100 (λ) lysogène pour le phage λ - L26, n'induit pas la multiplication du prophage à 41°. Chez ce mutant, l'arrêt de la division est donc du à l'absence du produit du gène parB , défaut qui se traduit en premier lieu par l'arrêt de la répartition des chromosomes, les synthèses macromoléculaires (DNA, RNA, masse cellulaire) se poursuivant normalement.

Présentement, l'identification des mutations de type par repose uniquement sur des critères morphologiques (cf planches). Un mutant de ce type est reconnu au fait qu'il forme des filaments dont les extrêmités sont dépourvues de noyaux, ceux-ci constituant une masse nucléaire centrale. Dans l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas possible de distinguer entre une inhibition de la séparation physico-chimique des copies de DNA et une inhibition de leur répartition le long de la cellule par l'intermédiaire de la membrane.

Si toutefois on envisage la deuxième hypothèse, il semble alors douteux que le défaut de partition à 41° puisse être dû à un "détachement" des chromosomes que l'on suppose attachée à la membrane à 30°. En effet, l'inactivation thermique du mutant MFT100 étant reversible, on conçoit mal qu'un nombre élevé de noyaux ainsi détachés puissent s'associer à nouveau à la membrane de façon correcte. En accord avec les hypothèses de Jacob, Brenner et Cuzin (1963), il est plus raisonnable de penser que c'est le processus de croissance zonale de l'enveloppe cellulaire entre les noyaux qui est ici perturbé. Cette éventualité va être examinée par la technique de Ryter, Hirota et Schwarz (p. VII) qui permet de reconnaître la zone de croissance de la paroi en effectuant un marquage bref de la muréine par du DAP radioactif.

Cette étude (cf. expériences de restauration de la division cellulaire à 30° en présence de chloramphénicol, p. 63) montre également que la synthèse du produit de gène par suffit à restaurer la division cellulaire. Il n'est donc pas indispensable pour cela que les noyaux aient retrouvé une position correcte le long de la membrane.

L'expression d'au moins deux gènes de type par, le gène parA décrit précédemment (p. 19) et le gène parB décrit ci-dessus fait donc partie de la séquence des évènements qui conduisent à la division de la cellule.

*

* *

CHAPITRE IV

MUTANTS REVERSES THERMORESISTANTS

Introduction

En entreprenant d'isoler des mutants reversés à partir de souches incapables de se diviser, on peut s'attendre à obtenir trois classes de mutations : a)des mutations reverses véritables à la suite desquelles un allèle muté redevient identique à l'allèle sauvage ; b) des mutations d'un gène suppresseur de type "faux-sens" ou "non-sens" qui permettent la synthèse d'une quantité suffisante de la protéine sauvage ; c) des mutations reverses de type "fonctionnel" qui affectent un gène et une protéine distincts du gène et de la protéine initialement mutés. De telles mutations corrigent au niveau fonctionnel le défaut créé par la première mutation.

C'est ce dernier type de mutant que l'on recherche plus particulièrement puisque l'on peut en tirer des enseignements sur la nature de la mutation initiale et sur celle de diverses autres fonctions qui sont susceptibles d'intervenir dans le processus de la division cellulaire et de sa régulation.

Parmi les fonctions qui présentent une relation plus ou moins bien comprise avec la division cellulaire, on peut citer les fonctions de type rec, la sensibilité au rayonnement ultra violet, l'induction de la multiplication du prophage λ et la sensibilité à divers composés dont notamment la mitomycine C (Howard-Flanders, Simon et Thériot, I964 ; Kirby, Jacob et Goldthwait, I967 ; Witkin, I967 ; Green, Greenberg et Donch, I97O ; Inouye, I971 ; Hirota et Ricard, 1972).

Les résultats préliminaires que nous allons décrire maintenant montrent effectivement que chez certains mutants reverses thermorésistants isolés à partir des souches de type fts et par les fonctions citées ci-dessus sont altérées.

I - Isolement des mutants.

Pour obtenir des mutants reverses indépendants, nous avons étalé à la surface de boîtes de milieu complet (ML ou MLO, cf Matériel et Méthodes, p.3) des échantillons de culture provenant d'une série de clones de la souche

parentale thermosensible. Parmi les colonies thermorésistantes qui sont apparues spontanément après 24 à 36 heures d'incubation à 41°, nous n'avons finalement conservé qu'un seul mutant par clone parental.

La fréquence de mutation varie entre $5,10^{6}$ et $5,10^{8}$ selon les souches et les milieux utilisés.

II. Sensibilité au rayonnement ultra-violet.

Nous avons vu précédemment qu'il existait une relation, de nature inconnue, entre la formation de cellules filamenteuses et l'induction du prophage λ (p.59). On sait par ailleurs que l'induction du prophage peut être également provoquée par les rayons UV. Il pourrait donc y avoir dans certaines conditions un rapport entre la division cellulaire et la sensibilité aux rayons UV. De fait, Kirby, Jacob et Goldthwait (1967) ont observé qu'une fraction notable de souches reverses thermorésistantes isolées à partir de la souche C-600 T44 (λ) présentaient tout à la fois une sensibilité accrue aux rayons UV et un phénotype rec .

Certains des mutants isolés à partir de nos souches possèdent des propriétés similaires, en ce qui concerne la sensibilité au rayonnement UV.

Le tableau qui suit indique quelle est la fraction des souches UV trouvées parmi les reverses thermorésistants que

nous avons étudiés. Un exemple est illustré par la fig.20 qui représente les sensibilités comparées des mutants PAT84rev26 et de la souche parentale thermosensible PAT84.

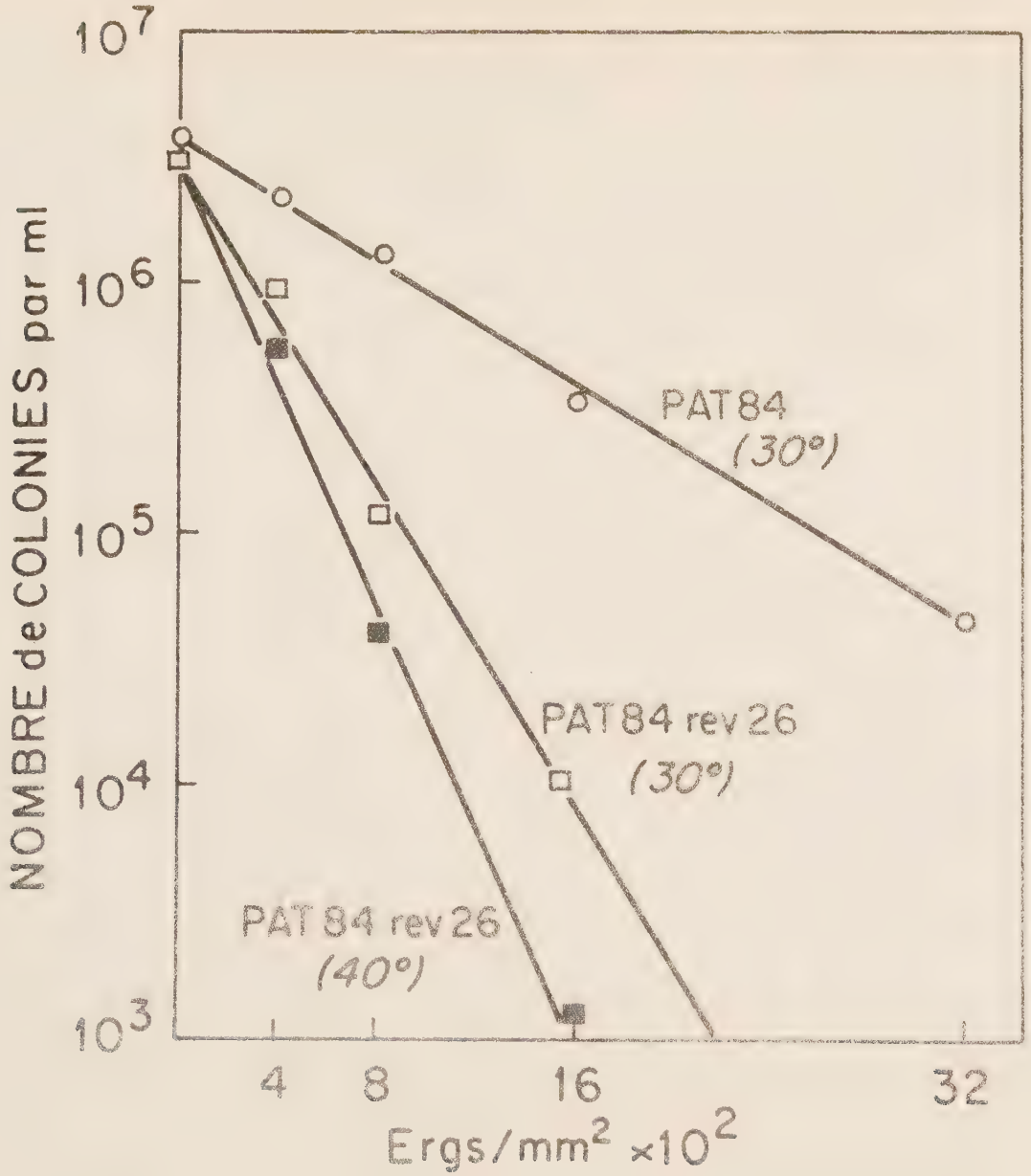
Type de la souche parentale	ftsA	ftsB	ftsD	ftsE	parB	MFT119 (fts)	MFT2 (fts)
Nombre de souches UVR parmi les reverses thermorésistants	23/57	I/I	I/3	7/9	IO/15	8/11	6/18

Le phénotype rec n'a pas été déterminé car les mutants reverses considérés sont généralement incapables de former des colonies sur milieu minimum à 41° sans que ce défaut ait pu être rapporté à une exigence auxotrophique simple. Ce phénomène n'a pas été analysé plus en détail.

III. Examen de l'exonucléase VII.

La présence éventuelle d'altérations de type rec chez certains mutants reverses nous a conduit à examiner l'activité de l'exonucléase VII, produit du gène recB-C, qui est le seul enzyme connu dans le système rec (Wright, Hurwitz et Buttin, 1971). Les mesures de l'activité de

Fig. 20. Survie de la souche PAT84 (ftsA) et d'un reverse thermoresistant, PAT84rev26, en fonction de la dose de rayonnement ultra violet reçue.
Les cellules en suspension dans du milieu M63 sont irradiées, et aussitôt après des échantillons sont prélevés, dilués et étalés à la surface de boites de milieu ML qui seront incubées à 30 ou à 41°. On compte le nombre de colonies formées après 24-36hrs d'incubation.


10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
NOMBRE de COLONIES par ml
PAT 84
(30°)
PAT 84 rev 26
(30°)
PAT 84 rev 26
(40°)
4
8
16
32
Ergs/mm² ×10²

l'exonucléase VII devant être effectuées en l'absence d'endonucléase I, nous avons isolé des mutants reverses thermorésistants à partir de souches MFT92E2 (ftsA-end) et MFTIOO (parB-end) chez lesquelles la mutation end avait été introduite au préalable.

Parmi les mutants thermorésistants ainsi obtenus, les souches MFT96E2R2 et MFTIOOE2R2 présentaient également une sensibilité accrue aux rayons UV. En collaboration avec le Dr.M. Wright, nous avons donc mesuré l'activité de l'exonucléase VII chez ces mutants. Les résultats de ces expériences ont montré que sur ce point, il n'existait aucune différence significative entre les mutants et leurs parents thermosensibles.

IV. Aspects génétiques

Dans trois cas, ceux des mutants MFT123E_1R_I (ftsE-end-rev) PAT84T3 (ftsA-rev : E. Sollomon, communication personnelle) et PAT84-rev 26 (ftsA-rev), il a été reconnu que la mutation qui confère à la fois la thermorésistance et la sensibilité au rayonnement UV, était une mutation secondaire localisée à proximité du gène thyA.

L'introduction de l'épisome F'15 (fig.2 souche W2985), suivie d'une sélection de mérozygotes thy^+, a montré que ces mutations secondaires étaient récessives par rapport à l'allèle sauvage.

V. Résistance à l'égard de la mitomycine C.

Nous verrons au cours du Chapitre suivant que la mitomycine C provoque des altérations au niveau du DNA et de la paroi cellulaire, altérations qui peuvent affecter la division et la morphologie de la cellule. Les faits nous ont amené à comparer l'effet de la mitomycine sur certains mutants thermosensibles et sur leurs reverses thermorésistants.

C'est ainsi que parmi 48 mutants thermorésistants isolés à partir de la souche PAT84 (ftsA), 3 présentent une résistance accrue à l'égard de la mitomycine. En effectuant l'opération inverse, il a été observé que parmi 42 clones de PAT84 résistants à la mitomycine (c'est-à-dire capables de former des colonies sur des boîtes de milieu complet contenant 2γ/ml de mitomycine C) , 15 étaient également thermorésistants (ces faits doivent être rapprochés des observations décrites p. 51 concernant la résistance à la mitomycine de la synthèse du DNA chez les cellules filamenteuses de PAT84).

En revanche, aucune relation de ce genre n'a été observée dans le cas du mutant MFT103 de type ftsD. En effet, parmi 23 reverses thermorésistants, on ne trouve aucune souche résistante à la mitomycine et parmi 20 souches résistantes à la mitomycine, aucune souche thermorésistante.

Ce phénomène n'étant pas général, il pourrait donc permettre d'établir de nouvelles distinctions entre les divers types de mutants fts et donner lieu à une analyse biochimique.

*

* *

L'isolement et la caractérisation rapide de mutants reverses thermorésistants a donc révélé l'existence de mutations qui corrigent la thermosensibilité du mutant original en altérant une autre fonction cellulaire. Ces altétations peuvent se traduire notamment par la sensibilité au rayonnement ultra-violet ou par la résistance à la mitomycine.

Il est surprenant de constater que l'on ait pu trouver des mutants reverses UVs parmi toutes les classes mutées examinées (ftsA,B, D, E, parB). On sait en effet que les synthèses macromoléculaires (DNA, RNA, protéines) se poursuivent normalement chez les mutants étudiés. Si certaines mutations fts peuvent être en rapport avec les mécanismes régulateurs qui couplent la synthèse du DNA et la division cellulaire, il est peu vraisemblable que toutes

le soient. Les hypothèses que l'on pourrait imaginer pour expliquer ce phénomène étant pour l'instant tout-à-fait gratuites, nous éviterons donc de les envisager.

CHAPITRE 5

MUTANTS RESISTANTS A LA MITOMYCINE

MUTATION *divC* - MUTATION *min*.

Introduction

Nous avons vu, au cours de l'Introduction générale, et des chapitres précédents, que l'arrêt soit de la synthèse, soit de la répartition des chromosomes inhibait la division cellulaire. Toutefois, cette inhibition peut être levée par une deuxième mutation de type *div*, qui ne corrige pas la mutation d'origine (*dna* ou *par*), mais permet néanmoins la formation de septa intercellulaires. Ces septa n'apparaissent pas au milieu de la cellule comme à l'ordinaire, mais aux extrémités des filaments, à une distance de l'un des pôles égale à la taille d'une cellule normale (2 µ environ). Les filaments formés en l'absence de synthèse ou de partition du DNA étant dépourvus de noyaux aux extrémités, les divisions provoquées par

une mutation div conduisent donc à la ségrégation de bactéries dépourvues de DNA. Deux classes de mutations div ont été identifiées précédemment, divA et divB (Hirota, Ryter et Jacob, I968 ; Hirota, Jacob, Ryter, Buttin et Nakai, 1968). Lorsqu'elles apparaissent spontanément au sein d'une culture de mutants de type dna ou par, ces mutations bénéficient d'une pression sélective favorable, les doubles mutants dna-div et par-div ayant un taux de croissance supérieur à celui de leurs parents respectifs.

Nous allons voir au cours de ce chapitre que l'on peut obtenir un troisième type de mutants div (divC) en sélectionnant des mutants résistants à la mitomycine C (Hirota et Ricard, I972).

*

* *

Les mutations de type div semblent intervenir au niveau d'un processus de régulation qui maintient la division cellulaire sous le contrôle du cycle de réplication et de ségrégation du DNA.

Il n'est pas interdit de penser que les rayons UV et les substances radiomimétiques comme la mitomycine C puissent également avoir une action au même niveau. Ceci nous est suggéré par l'exemple des mutants de type lon .

Chez ces mutants en effet, les rayons UV sont capables de provoquer la formation de cellules filamenteuses sans que la synthèse du DNA soit inhibée (Walker et Pardee, 1967). Il semble que ce soient les relations entre la synthèse du DNA et la division qui sont affectées : lorsqu'après une période de carence, on ajoute de la thymine à une souche thy lon$^-$ et à une souche thy$^-$ lon$^+$, on remarque que la synthèse du DNA reprend simultanément chez ces deux souches, mais que le délai qui s'écoule ensuite avant la reprise de la division est trois fois plus long chez la souche lon$^-$ que chez la souche lon$^+$. Ce retard semble spécifique de la relation DNA-division : en effet, si l'on provoque l'arrêt de la division non pas par une carence en thymine, mais en faisant agir de faibles concentrations de pénicilline, on observe que la division cellulaire reprend simultanément chez les souches lon$^-$ et lon$^+$ (Leighton et Donachie, 1970), après que l'on ait éliminé la pénicilline.

Si les mutations div et la sensibilité aux rayons UV ou à la mitomycine ont un effet sur les mécanismes qui couplent la synthèse du DNA et la division cellulaire, on peut donc espérer obtenir des mutations de type div en sélectionnant des clones résistants à la mitomycime à partir de mutants de type dna ou par. C'est ce qui a été réalisé

avec les mutants MFT100 de type parB et CRT1425 de type dnaB.

Le mutant MFT100 cesse de se diviser à 41° et forme de longs filaments dont les extrémités sont dépourvues de noyaux (planche E , p. 17)

Parmi 10 clones de MFT200 résistants à la mitomycine, on trouve six clones thermorésistants et quatre clones thermo-sensibles dont deux produisent à 41° de nombreuses bactéries dépourvues de DNA (20 à 35% de la population après 2 à 3 heures de culture). Ces deux dernières mutations ont été qualifiées de divC.

L'étude de l'un de ces mutants, MFT1002 (parB-divC) a montré que les cellules survivaient plus longtemps à 41° que celle du type parental MFT100 (fig.21, la survie est mesurée par le nombre de colonies formées à 30° par des échantillons de culture prélevés à 41°) et que le gène divC responsable tout à la fois de la résistance à la mitomycine C et de la ségrégation des cellules anucléées était localisé entre les locus trp et his de la carte chromosomique d'E.coli (Taylor, 1970), à proximité du locus his (tableau 21).

De la même façon, l'isolement de souches résistantes à la mitomycine à partir du mutant de type dnaB,CRT1425, a permis de trouver 5 souches de type divC parmi 8 mutants indépendants. Tous sont restés thermosensibles.

fig. 21 - Survie à 30° et 41° de la souche MFT100 (par B) et du dérivé MFT1002 (par B- divC) qui est résistant à l'égard de la mitomgaine C, et qui produits des bactéries anuclées.

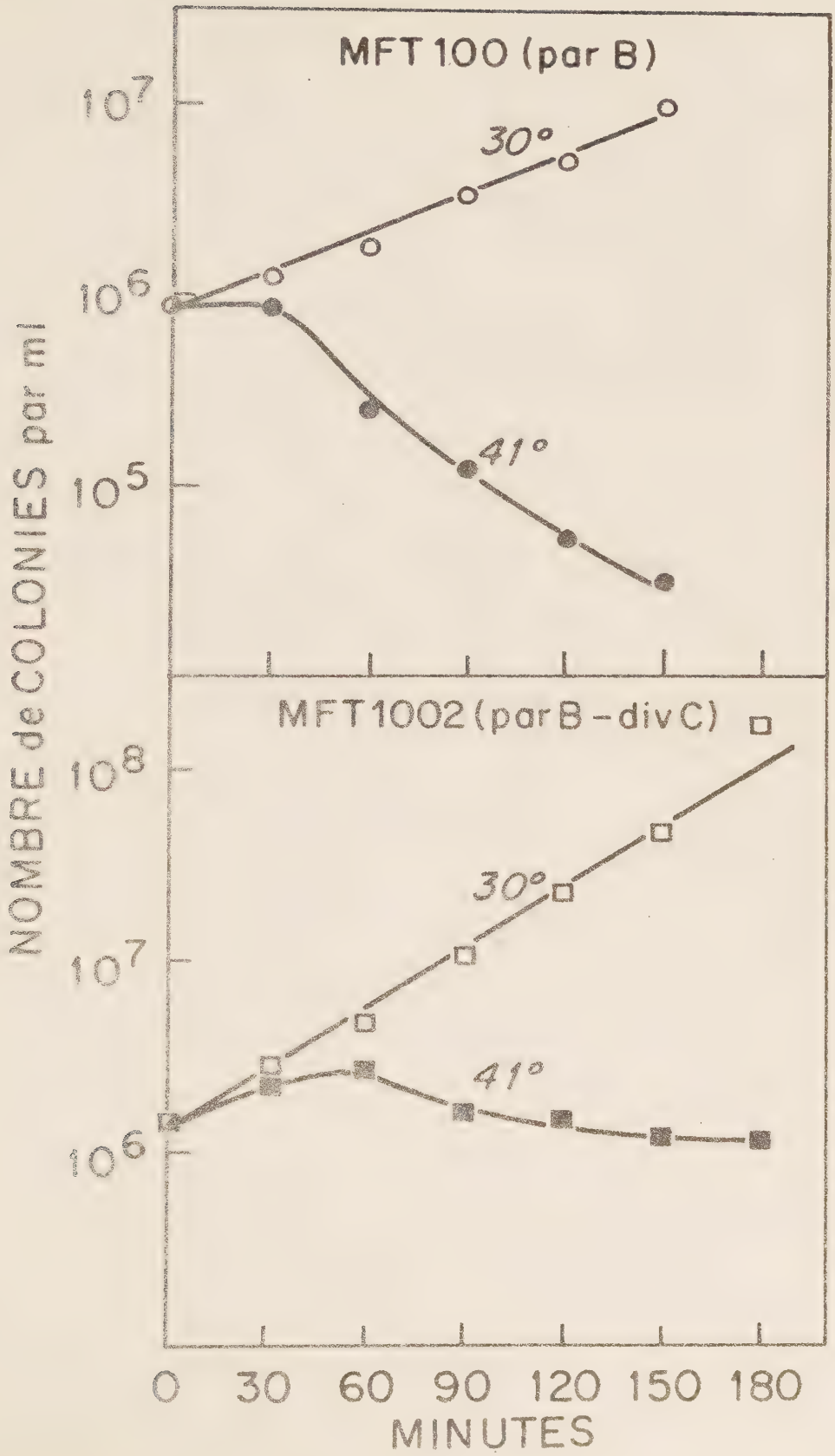

MFT 100 (par B)
10^7
10^6
10^5
30°
41°
MFT 1002 (par B - div C)
10^8
10^7
10^6
30°
41°
NOMBRE de COLONIES par ml
0 30 60 90 120 150 180
MINUTES

TABLEAU 21

Analyse des croisements réalisés

avec la souche MFT1002 (parB-divC)

1 représente un caractère hérité du mâle Hfr

0 le caractère original de la F^-

Tableau 21

nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants							Nombre de colonies analysées	Constitution génétique des recombinants			
		thr leu	lac	trp	divC	his	thyA	argH					
HfrCA190 ($divC^+$) x MFT1002	his	9	26	32	73	100	9	2	31	trp	divC	his	Nombre
										1	1	1	10
										0	1	1	15
										1	0	1	1
										0	0	1	5

Si dans une culture de la souche parentale qui a séjourné 2 heures à 41°, on trouve moins de I% de cellules anucléées, en revanche on en trouve de 10 à 25% chez les dérivés divC.

Les mutations de type div, autres que divC qui confère également à la croissance à l'égard de la mitomycine, ne se manifestent pas de façon aisément reconnaissable lorsqu'elles ne sont pas associées à une mutation thermosensible de type dna ou par. Toutefois, il est possible de montrer que des mutations div existent chez des souches sauvages thermorésistantes.

Si l'on transduit par exemple le gène dnaB de la souche HfrT42 (div) chez deux souches thermorésistantes, PA505 et PA505MBΔ101C, on observe que les clones transduits thermosensibles obtenus avec la souche PA505 produisent moins de 1% de cellules anucléées après deux heures de culture à 41°, tandis que ceux qui ont été obtenus avec la souche PA505MBΔIOIC en produisent de IO à 15% dans le même intervalle. Nous avons donc conclu que la souche PA505MBΔIOIC portait une mutation div dont l'existence a été révélée par l'introduction du gène dnaB.

*

* *

L'interprétation de l'ensemble des résultats obtenus à l'aide de la mitomycine C n'est guère aisée. En effet, cet antibiotique a un mode d'action complexe. Nous avons suggéré que la résistance à la mitomycine pouvait être associée au phénotype div et à la thermorésistance en intervenant au niveau du couplage entre la synthèse du DNA et la division. Toutefois, d'autres explications peuvent être envisagées. Il est bien connu,en effet, que la mitomycine agit principalement au niveau du DNA en créant des ponts covalents entre les deux brins de la double hélice (Iyer et Szybalski, I963 ; Weissbach et Lisio, I965). Toutefois il a été trouvé récemment que ce composé pouvait également avoir un effet au niveau de la paroi cellulaire (Henning et Schwarz,I972).

Ceci a été montré chez un mutant d'E.coli K.12, de type rod, qui passe d'une forme normale en bâtonnet à une forme sphérique lorsque la température est portée de 30 à 41°. Cette modification est reversible, mais si on ajoute de la mitomycine C ou si on appauvrit le milieu en thymine au moment de ramener la température à 30°, les cellules ne reprennent pas leur forme normale mais acquièrent l'aspect de "monstres" géants et polymorphes. Il a pu être montré que les macromolécules de muréine (sacculi) isolées à partir de ces "monstres" présentent

les mêmes anomalies.

Par ailleurs, lorsqu'on soumet une souche E.coli C soit à l'action de la mitomycine, soit à une carence en thymine, on observe la formation de filaments ramifiés de diamètres variables.

On sait que des nucléotiques entrent dans la composition de la paroi, la synthèse du DNA pourrait donc être couplée d'une façon ou d'une autre avec l'assemblage de la paroi cellulaire.

Les effets primaires ou secondaires de la mitomycine sont donc multiples et variés. On peut donc envisager autant de manières d'associer la résistance à la mitomycine avec l'apparition de la thermorésistance ou du phénotype div chez des mutants de type dna, par et fts. Les deux hypothèses qui semblent devoir être envisagées en premier lieu sont :

a) une intervention au niveau des mécanismes régulateurs qui associent la division cellulaire à la réplication du DNA.

b) la correction d'une altération de la paroi qui empêche la cellule de se diviser.

*

* *

Pour tenter de mieux comprendre le mode d'action des mutations div, il semble intéressant d'établir une comparaison avec les mutations de type min.

Une mutation div provoque la ségrégation des bactéries anucléées de taille normale, la septation se produisant à 2 µ, des extrêmités des filaments. Cette ségrégation, contrairement au processus normal de la division, peut se produire en l'absence de synthèse du DNA.

Un mutant min en revanche segrège de très petites cellules sphériques de 1 µ de diamètre qui peuvent se former en n'importe quelle partie du filament. Contrairement au cas précédent, l'inhibition de la synthèse du DNA arrête la production de minicellules (Clark, 1968). Il semble donc que les mutations div touchent le système régulateur qui contrôle le déclenchement de la division, tandis que chez les mutants min, ce contrôle subsiste mais c'est le mécanisme qui détermine l'emplacement du septum qui semble affecté.

Au cours de notre étude, nous avons eu l'occasion de préciser la localisation génétique du locus minA décrit précédemment (Adler et col., 1967 ; Hirota et col.,1968). Il a été montré (Tableau 22) que la mutation minA du mutant CRT12 était distincte des mutations tsx (thermosensibilité), mtc (sensibilité à l'éosine et au bleu de

méthylène) et uvr (sensibilité au rayonnement ultra - violet) également portées par cette souche dans la même région du chromosome. L'ordre des gènes, qui peut être déduit de la composition génétique des recombinants obtenus est :

uvr lac mtc tsx min gal

TABLEAU 22

Analyse des croisements réalisés

avec la souche CRT12 (minA)

1 représente un caractère hérité du mâle Hfr et

0 le caractère original de la F^-

Tableau 22

Nature du croisement	Sélection	Fréquence d'apparition des caractères Hfr parmi 100 clones recombinants					Nombre de colonies analysées	Constitution génétique des recombinants					
		uvr	lac	mtc	ts	minA		uvr	lac	ts	mtc	min	Nombre
HfrP4X6 (TR, min^+, mtc^+, uvr^+) x CRT12 (ts, minA, mtc, uvr)	lac	38	100	45	43	36	39	1	1	1	1	1	10
								1	1	1	1	0	2
								0	1	1	1	1	6
								1	1	0	0	0	4
								0	1	0	0	1	1
								0	1	0	1	0	1
								0	1	0	0	0	13
								Tous les autres types					0

CHAPITRE 6

EFFET DES SELS ET AUTRES COMPOSES SUR L'EXPRESSION DE DIVERSES MUTATIONS

Introduction.

Au cours de notre étude, nous avons incidemment mis en évidence un effet des sels et d'autres composés (saccharose, glycérol; glucose) sur l'expression d'une grande variété de mutations concernant notamment la division cellulaire, la synthèse du DNA, la sensibilité au rayonnement ultraviolet et à la pénicilline (Ricard et Hirota, 1969).

Cet effet se traduit par la restauration du phénotype sauvage.

Un effet similaire a été décrit précédemment dans le cas de mutants auxotrophes de la levure (Hawthorne et Friis, 1964) et confirmé par la suite chez E.coli par

divers auteurs dans le cas de mutants de types fts, urt et dnaB (Reeves, Groves et Clark, 1970 ; Shimazu, Morimyo et Suzuki, 1971 ; Gross, 1972).

Au cours de ce chapitre, nous examinerons l'effet de sels sur les diverses fonctions mutées que nous venons de citer (§ 1 à IV) et nous tenterons d'expliquer leur mode d'action (§ VI et VII).

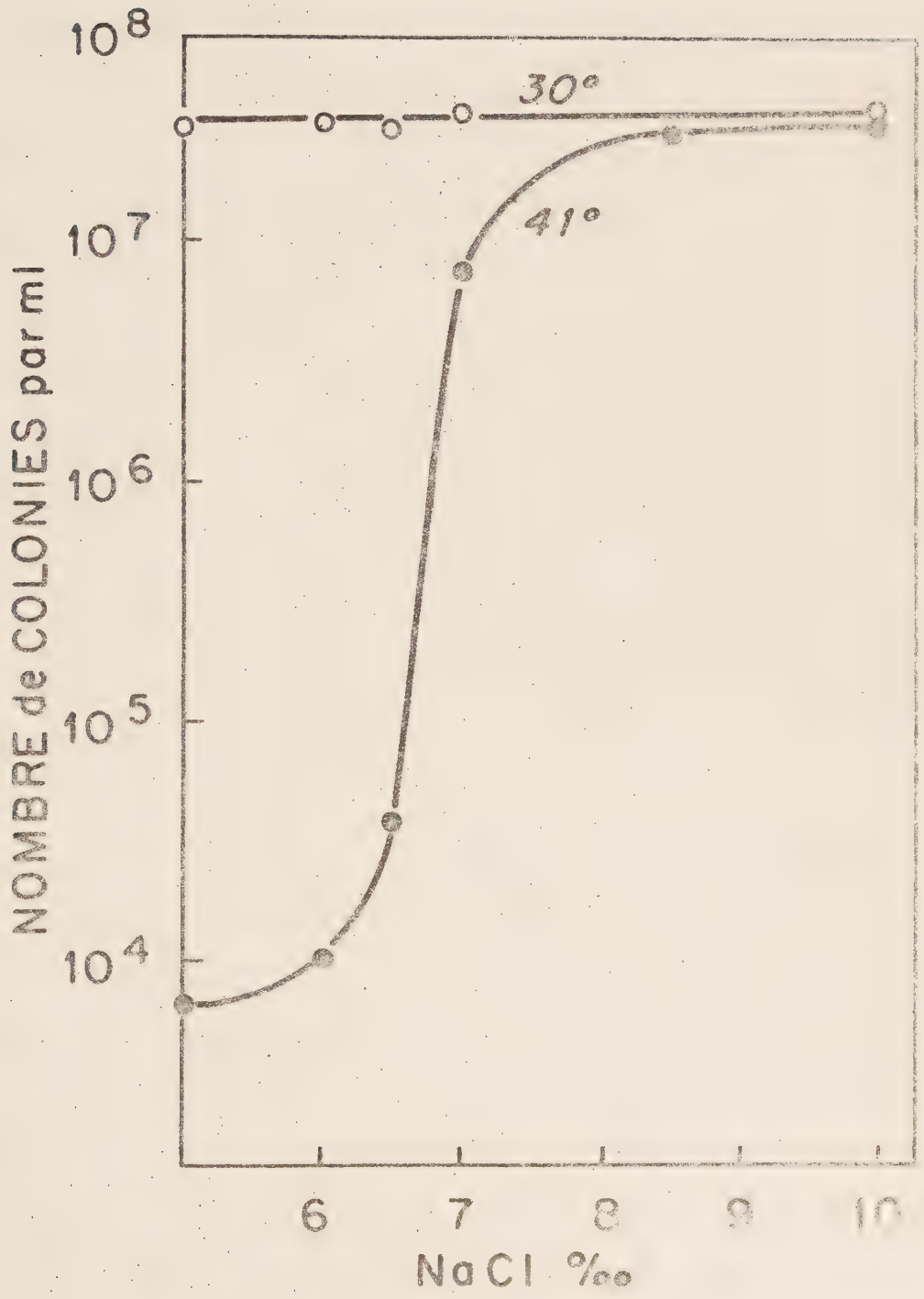
Pour réaliser ces expériences, nous avons généralement utilisé le chlorure de sodium : toutefois, nous verrons que l'on peut également utiliser d'autres composés dont nous comparerons les effets (§ V).

I- Effet du NaCl sur des mutants de division cellulaire (mutants de type fts)

Le mutant PAT84 (ftsA) est incapable de former des colonies à 41° sur des boites de milieu complet ML ou MLO (cf. Matériel et Méthodes, p. 3).

Toutefois, lorsque l'on augmente la concentration en sel, cette souche forme des colonies à haute température comme une souche sauvage thermorésistante. Le changement phénotypique se produit au voisinage d'une concentration critique, dans un invervalle de concentration très réduit (fig. 22).

La fig. 22 met en lumière la variation de la capacité qu'ont les cellules du mutant PAT84 (ftsA) de former des colonies à 30° (o—o) ou à 41° (●—●) en fonction de la concentration en sel du milieu (ML) à la surface duquel les échantillons sont étalés.


10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
30°
41°
NOMBRE de COLONIES par ml
6
7
8
9
10
NaCl ‰

La concentration critique nécessaire à cette restauration a été définie comme le point d'inflexion de la courbe représentant le logarithme décimal du nombre de colonies formées à 41° en fonction de la concentration en NaCl.

En milieu liquide de ML (contenant 5% de NaCl) la division cellulaire s'arrête immédiatement à 41° et de longues cellules filamenteuses sont formées. Si après une heure de préincubation à 41° on ajoute du NaCl à la culture (10% final), les filaments se divisent activement. Cette restauration de la division n'est pas inhibée par l'addition simultanée de chloramphénicol (75γ/ml ; résultats comparables à ceux de la fig.7). Elle est donc indépendante de toute synthèse protéique de novo.

Le tableau 23 rassemble les données qui concernent l'effet des sels sur l'ensemble des mutants du types fts, par et dna.

II. Effets du NaCl sur des mutants de réplication du DNA.

Chez le mutant CR34BT313 (dnaB) cultivé en milieu 63, la synthèse du DNA s'arrête immédiatement lorsque la température d'incubation est portée à 41°. Toutefois, si l'on ajoute du NaCl (20%) au milieu, cette synthèse reprend aussitôt et se poursuit normalement. La fig.23 illustre les résultats que l'on peut obtenir lorsque le NaCl est ajouté soit au moment même de l'élévation de la température, soit

TABLEAU 23

Ce tableau décrit l'effet du NaCl sur la capacité de divers mutants de former des colonies à 41°

Tableau 23

Mutant	Effet du NaCl	Concentration critique NaCl %
ftsA		
MFT1	+	10
33	-	
96	+	5,5
109	+	-
1182	+	18
PAT84	+	6,5
ftsB		
MFT84	+	6
ftsC		
MFT108	+	5
ftsD		
MFT103	-	
1111	+	7
ftsE		
MFT99	+	3
MFT1181	-	
MFT123	+	7
ftsF		
MFT1141	+	6,5
ftsG		
MFT29	-	
CRT115	-	
parA		
PAT32	-	
MFT110	-	
parB		
MFT100	-	
dnaA		
CRT46	-	
CRT83	-	
dnaB		
T42	+	
BT42	+	
BT43	+	13
BT313	+	12,5
BT500	-	
BT454	-	
BT59	-	
T142	-	
T266	-	
dnaE		
E436	+	≃ 2 %

La fig. 23 illustre dans sa partie supérieure la capacité qu'ont les cellules du mutant CR34 BT313 (dnaB) de former des colonies à 30° (□—□) ou à 41° (■—■) en fonction de la concentration en sel du milieu d'étalement (milieu ML).

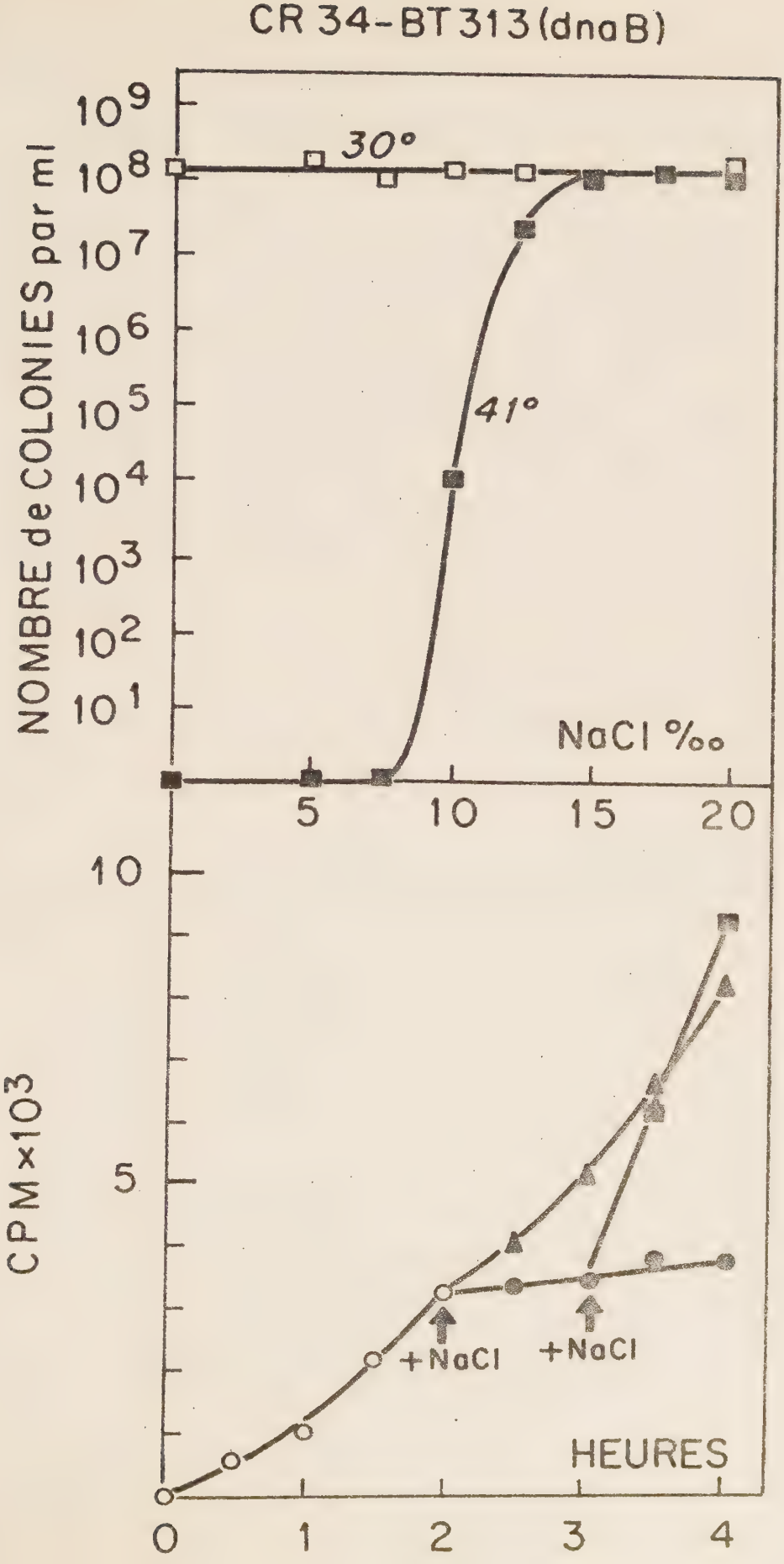
La partie inférieure représente l'incorporation totale de thymidine ^{3}H en fonction du temps (milieu M63).

o—o à 30°

●—● à 41°

▲—▲ à 41° avec addition de NaCl 20‰ au moment de l'élévation de la température

■—■ à 41° avec addition de NaCl 20‰ après 1 heure de préincubation à 41° en milieu M63.


CR 34-BT 313 (dnaB)
NOMBRE de COLONIES par ml
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
30°
41°
NaCl ‰
5
10
15
20
CPM ×103
10
5
+NaCl
+NaCl
HEURES
0
1
2
3
4

après 60 min. d'incubation à 41°.

Cet effet n'est pas inhibé par le chloramphénicol (100 γ/ml) : si après 60 min. d'incubation à 41°, on ajoute du chloramphénicol en même temps que le NaCl, la synthèse du DNA reprend et se poursuit pendant 60 min. alors que la croissance cellulaire est immédiatement arrêtée.

Le mutant étudié (CR34BT313) est incapable de former des colonies à 41° sur milieu ML (NaCl 5%). Toutefois, lorsque la concentration en NaCl atteint ou dépasse I2,5%, le nombre de colonies formées à 41° est multiplié par 10^7 (fig.23).

D'autres mutants du type dnaA, dnaB et dnaE sont également susceptibles d'être guéris par addition de NaCl (tableau 23 et Gross, 1971).

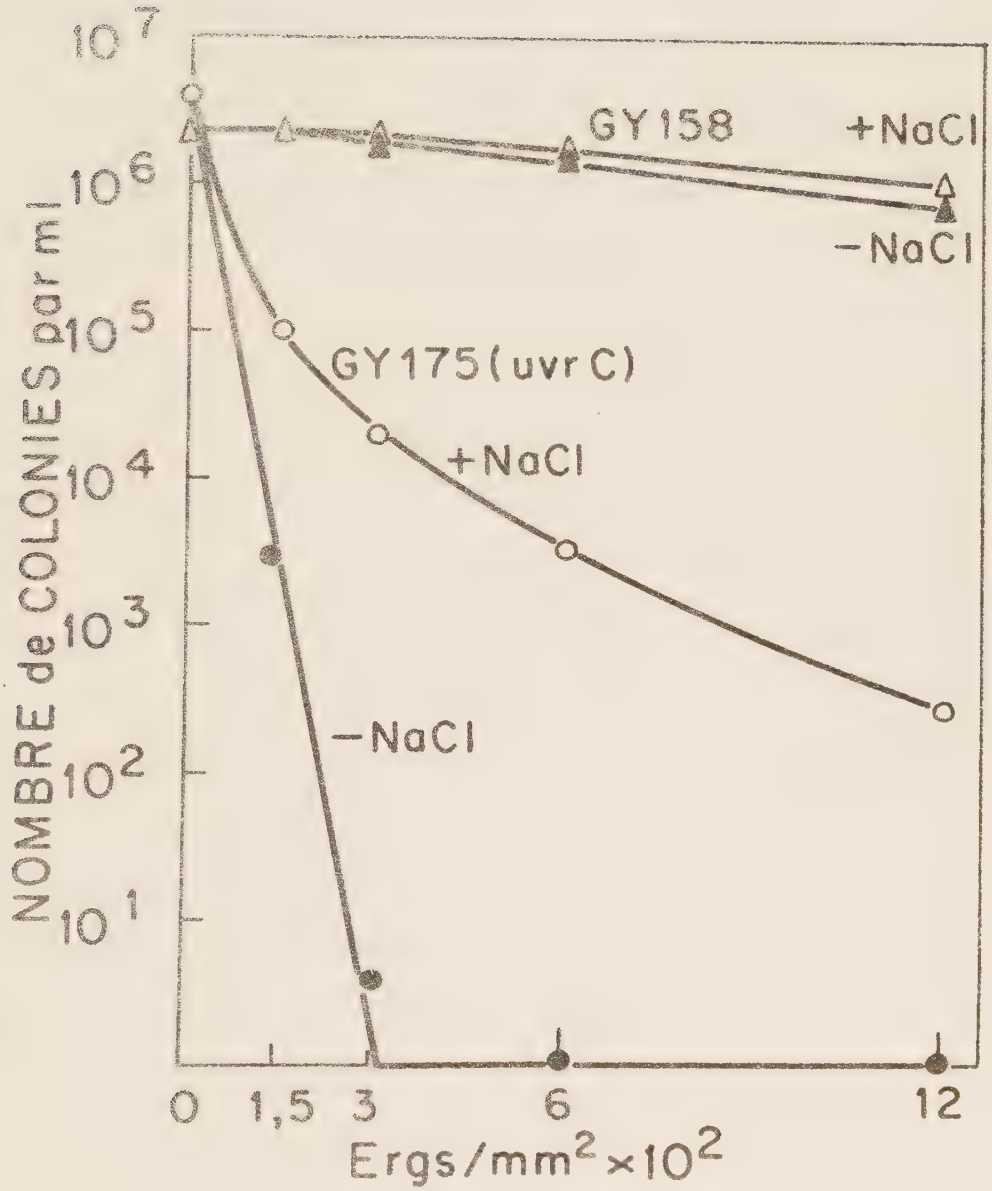
III. Effet du NaCl sur des mutants sensibles au rayonnement ultra-violet.

Le NaCl est également susceptible de modifier l'expression phénotypique de plusieurs types de mutations qui provoquent normalement une sensibilité accrue à l'égard des rayons UV .

A) Lorsque des cellules du mutant GY175 (uvrC) sont étalées à la surface de boîtes de différents milieux après avoir été irradiées par des rayons UV, on observe que le nombre de cellules capables de former des colonies est considérable-

Fig. 24. Survie des souches GY158 et GY175 (uvrC) en fonction de la dose de rayonnement ultra violet reçue et de la concentration en NaCl du milieu d'étalement.
Les cellules en suspension dans du milieu M63 sont irradiées et aussitôt après des échantillons sont prélevés, dilués et étalés à la surface de boites de ML contenant 5 ou 20‰ de NaCl. Après 24hrs d'incubation à 37°, le nombre de colonies formées est compté.

Δ—Δ GY158 irradié puis étalé sur des boites de ML, NaCl 20‰
▲—▲ " " " " " 5‰
○—○ GY175 " " " " 20‰
●—● " " " " " 5‰


NOMBRE de COLONIES par ml
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
GY 158
+NaCl
−NaCl
GY 175 (uvr C)
+NaCl
−NaCl
0
1,5
3
6
12
Ergs/mm² × 10²

ment accru sur milieu riche en NaCl (fig.24). Ceci est également vrai du mutant GY174 (uvrC).

Le sel n'exerce en revanche aucune influence sur la sensibilité aux rayons UV du type parental GY158 et du mutant GY173 (uvrC).

B) Récemment, Shimazu, Morimyo et Suzuki (1971) ont observé un effet similaire chez un mutant de type urt (URT43) dont le gène muté est indistinguable génétiquement du gène uvrA.

C) On sait que E.coli B forme des filaments lorsqu'on le cultive pendant 120 min. en milieu riche (Kantor et Deering, 1967) après irradiation par les rayons UV (25 ergs/mm^2). Cette souche porte en effet une mutation de type lon.

Les auteurs avaient observé que l'on pouvait prévenir la formation des filaments en conservant les cellules en milieu tampon non nutritif pendant un certain laps de temps avant de les remettre à croître en milieu riche. D'après l'hypothèse proposée, ce serait la richesse nutritive du milieu dans lequel les bactéries sont placées immédiatement après l'irradiation qui déterminerait leur capacité à se diviser par la suite.

Nous avons montré quant à nous que le facteur influent serait la concentration en sel et non pas la richesse du milieu. En effet, après irradiation aux rayons UV de la

souche E.coli B des filaments se forment en milieu complet ML (NaCl 5 °/oo) mais non pas en milieu ML enrichi en NaCl (15 o/oo), milieu dans lequel les cellules se divisent normalement. Si l'on considère par ailleurs la composition des milieux utilisés par Kantor et col., on remarque que le milieu non nutritif utilisé pour prévenir la formation de filaments possède une concentration élevée en sels, contrairement au milieu complet.

IV- Effet du NaCl sur la sensibilité à la pénicilline.

On sait que l'addition de faibles concentrations de pénicilline G (20 /ml) à E.coli K12 se traduit par la formation de cellules filamenteuses (Starka et Morarova, I967 ; Schwarz, Asmus et Frank, 1969).

Toutefois, nous avons observé que l'expression de ce phénomène dépendait également de la concentration en NaCl du milieu de culture.

En effet l'addition de 20 /ml de pénicilline G à la souche sauvage C-600 a montré que (fig.25) :

a) en milieu ML riche en sel (NaCl 20%) il se forme des cellules filamenteuses, conformément aux observations citées ci-dessus.

b) En milieu ML-O pauvre en sel en revanche, les cellules croissent et se divisent normalement comme celles de la

Fig. 25. Cinétique de division cellulaire. Influence du NaCl sur la sensibilité de la souche C-600 à l'égard de la pénicilline G (20 unités internationales par ml, ajoutées au temps zéro).

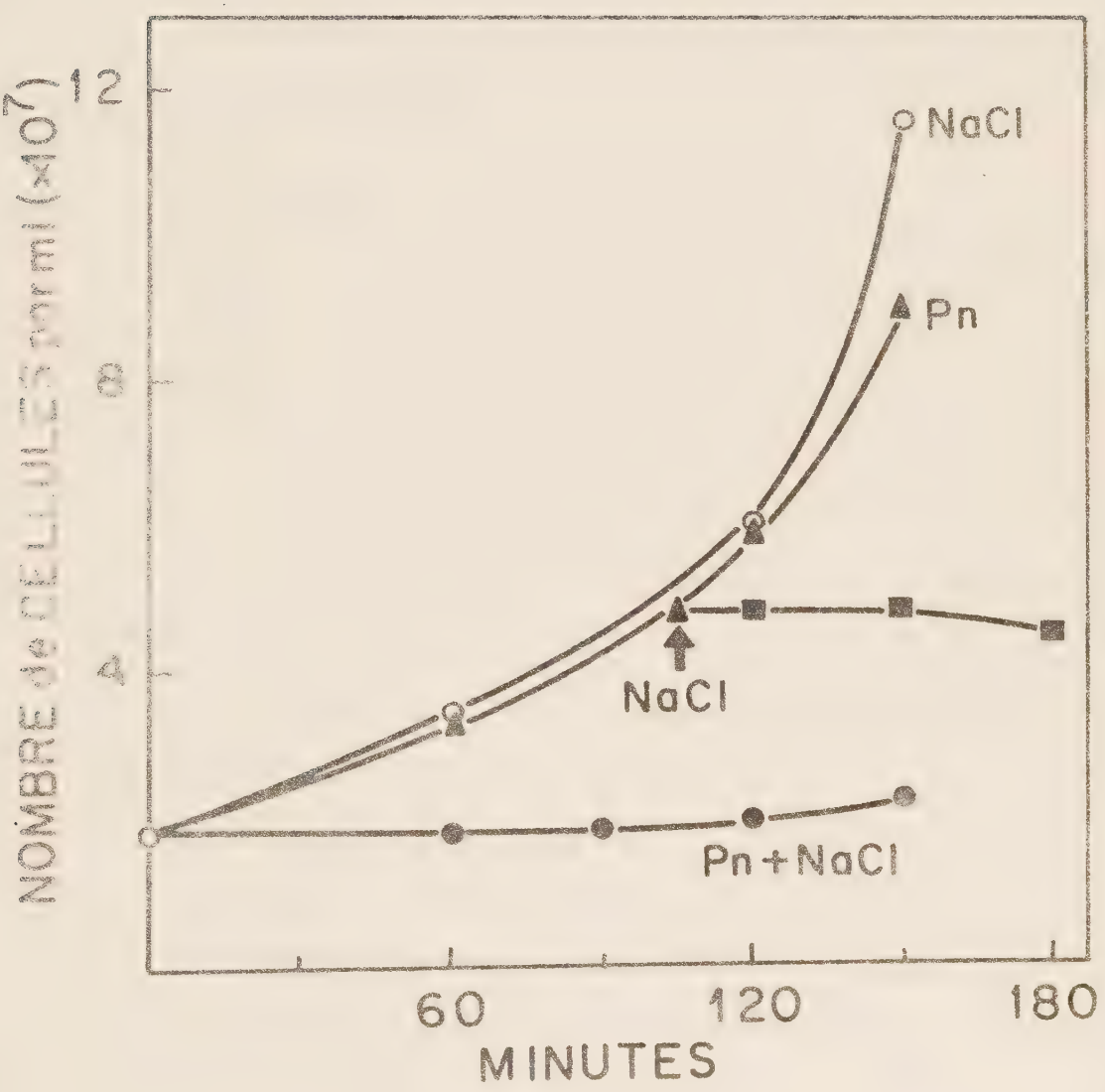
●—● en milieu ML contenant 20u/ml de Pn et 20‰ de NaCl, les cellules ne se divisent pas

▲—▲ en milieu ML contenant 20u/ml de Pn et 0‰ de NaCl, les cellules se divisent

■—■ si l'on ajoute (↑) du NaCl (20‰ final) à la culture précédente, la division s'arrête

o—o en l'absence de pénicilline, les cellules se divisent normalement dans le milieu ML contenant 20‰ de NaCl.

Les dénombrements cellulaires sont réalisés à l'aide d'un coulter-counter.


NOMBRE de CELLULES/ml (×10⁷)
12
8
4
NaCl
Pn
NaCl
Pn+NaCl
60
120
180
MINUTES

culture témoin qui ne contient pas de pénicilline.

c) si après 60 min. on ajoute du NaCl 20% à la culture précédente, la division cellulaire s'arrête immédiatement et la croissance se poursuivant normalement, des cellules filamenteuses sont formées.

L'ensemble des phénomènes décrits dans les paragraphes I à IV seront discutés dans les paragraphes qui suivent.

V. Effets comparés des divers sels et d'autres composés.

Dans les expériences décrites ci-dessus, il n'a été question que de l'action du NaCl, cependant d'une façon générale, on peut obtenir des effets similaires en utilisant n'importe quel composé pris parmi une grande variété de sels (KCl, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2$) ou de sucres (saccharose, glucose, glycérol). Si dans la plupart des cas ces composés semblent agir de façon osmotique, nous allons voir toutefois que le nombre des exceptions observées indique que d'autres facteurs interviennent également.

A l'aide du mutant PAT84 (*fts*A), il a été montré que la restauration de la division cellulaire à haute température pouvait être obtenue par l'addition de sels et de sucres variés.

Lorsque l'on représente le logarithme décimal du nombre de colonies formées à 41° en fonction de la concentration

du milieu en KCl, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2$, ou en saccharose, on obtient des courbes de même type que celle qui est illustrée par la fig 22. Il est également possible de combiner l'action d'un sel et d'un sucre (fig.26). Les concentrations critiques (voir définition p. 86) qui permettent la restauration de la division sont données dans le tableau ci-dessous :

Composé	Concentration critique (%)		Valeur osmotique $N = \frac{C \times M}{\text{nb d'ions}}$
	%	molaire $\times 10^2$	
NaCl	0,65	11	19
KCl	0,7	9,4	26
NH_4Cl	0,37	7	10
$(NH_4)_2SO_4$	0,6	4,5	26
$CaCl_2$	0,5	3,4	24
saccharose	0,65	19	22

C en %, M = molarité, nb d'ions = 1 pour les sucres.

Le glucose est également actif (la concentration critique qui se situe entre 1 et 2,5 n'a pas été déterminée avec précision).

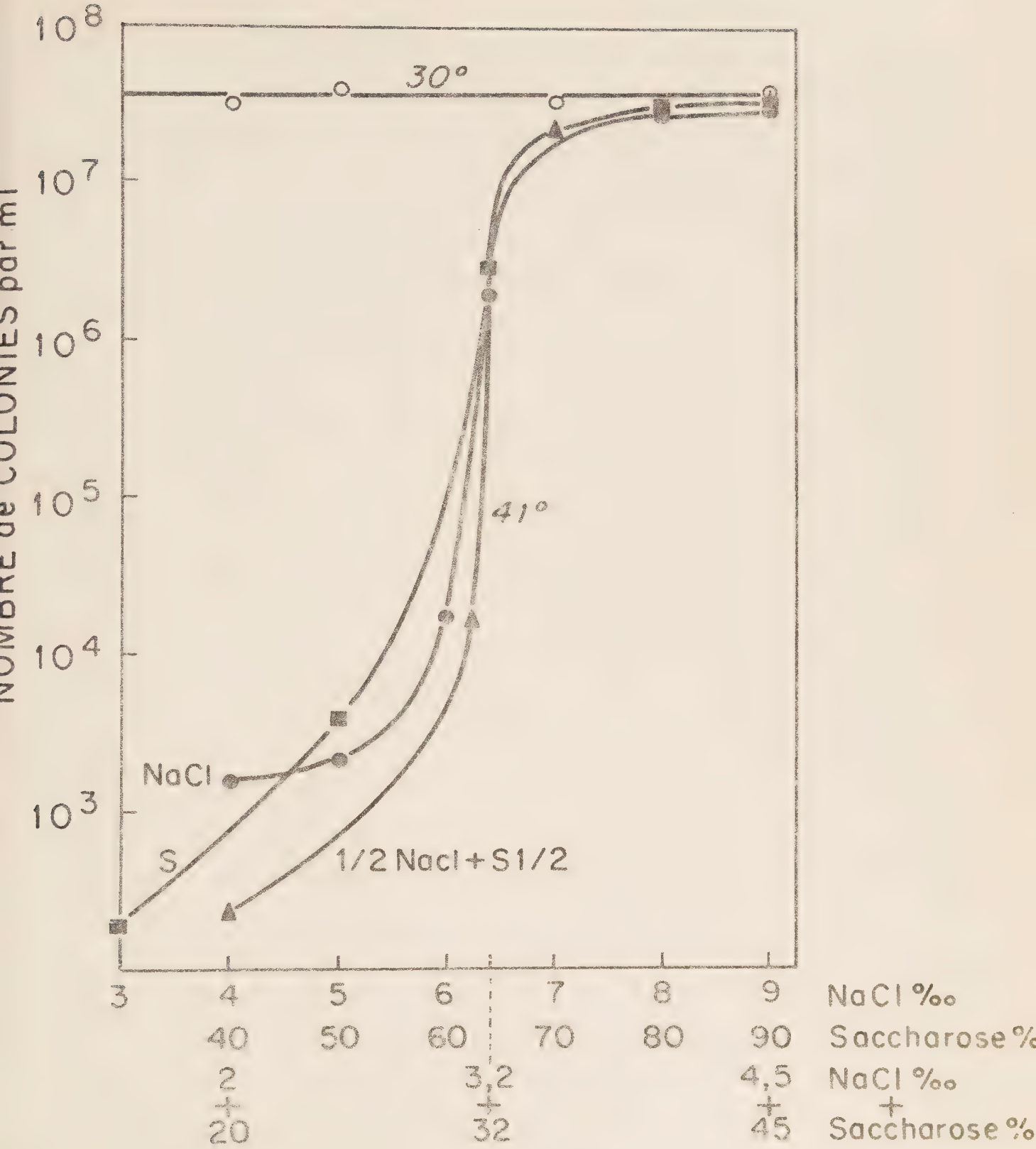
La fig. 26 illustre la capacité qu'ont les cellules de PAT84 (ftsA) de former des colonies à 30 et à 41° en fonction de la concentration du milieu (ML) d'étalement en :

o—o et ●—● NaCl

■—■ saccharose

▲—▲ un mélange de NaCl et de saccharose contenant des concentrations moitié des précédentes

Ceci montre donc l'additivité des effets de ces deux composés.


NOMBRE de COLONIES par ml
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
30°
41°
NaCl
S
1/2 Nacl + S1/2
3
4
5
6
7
8
9
NaCl ‰
40
50
60
70
80
90
Saccharose %
2
+
20
3,2
+
32
4,5
+
45
NaCl ‰
Saccharose %

On voit que même si l'on ne tient compte que des composés qui exercent un effet, la loi osmotique est suivie très imparfaitement, certaines des valeurs obtenues différant par un facteur 2,6 (26 pour KCl et $(NH_4)_2SO_4$, 10 pour NH_4Cl). De plus, certains composés restent sans effet : le $MgCl_2$ (pour des concentrations non toxiques à 30° allant de 1 à 20°/oo et le glycérol (pour des concentrations comprises entre 1 et 50 °/oo).

L'efficacité des sucres interdisant d'envisager une action de type purement ionique, on voit par conséquent qu'il est difficile d'expliquer des phénomènes par une loi physique simple.

D'autres exemples confirment ce dernier point. Les effets du NaCl (20 °/oo) et du saccharose ont été comparés chez une série de mutants thermosensibles de types fts, par, dna et autres : si la plupart des mutants réparables par le NaCl le sont également par la saccharose, il existe cependant un nombre notable d'exceptions.

Les diverses catégories trouvées sont les suivantes :

mutants réparables par le NaCl et par la saccharose :	20 (37%)	
mutants réparables seulement par le NaCl :	8 (15%)	67%
mutants réparables seulement par la saccharose	7 (13%)	
mutants qui ne sont réparables ni par le NaCl ni par la saccharose :	19 (33%)	

Par ailleurs, parmi tous les mutants de type fts et dna de notre collection, un seul, MFT96 (ftsA) est réparable par le glycérol (de 1 à 50 o/oo).

Dans le cas du mutant URT43, Shimazu et col.(1971) ont montré que l'on pouvait utiliser indifféremment le saccharose ou le NaCl pour obtenir le phénomène de résistance à l'égard du rayonnement ultraviolet. Au contraire, chez le mutant CR34BT314 (dnaB), l'addition de saccharose (5, 10 ou 20%) à la place du NaCl ne restaure pas la synthèse du DNA à 41°.

S'il semble difficile de dégager une loi simple qui rende compte des effets comparés des agents utilisés, nous allons voir en revanche que l'on peut avancer une explication plausible de leur mode d'action sur l'expression des mutations étudiées.

VI. Aspects génétiques.

Si l'on considère l'effet des sels du point de vue génétique, on arrive à une conclusion qui est importante pour la compréhension de cet effet, à savoir que la possibilité d'être réparé par les sels est une caractéristique de l'allèle et non du gène.

On peut constater tout d'abord que l'effet du NaCl n'est pas limité à un type de mutant particulier. Il a été observé chez des mutants de types très variés (fts, dna, uvr, urt, chez E.coli, mutants auxotrophiques chez la levure). Or, dans la plupart des cas, on trouve que parmi diverses mutations d'un même gène, certaines sont réparables par les sels et d'autres ne le sont pas (tableau 23). Par ailleurs, lorsqu'on transduit avec le phage P1 divers allèles d'un même gène dans une souche de constitution génétique distincte (C-600), on observe que les réponses à l'action du NaCl sont conservées qualitativement et quantitativement (fig.27).

Hawthorne et Friis (1964) ont également constaté que l'effet de la pression osmotique sur des mutants auxotrophiques de la levure était une caractéristique de l'allèle et ne ségrégeait jamais indépendamment du caractère muté.

C'est donc la nature de la mutation qui est en cause et non pas celle du gène.

VII. Mode d'action et conclusion.

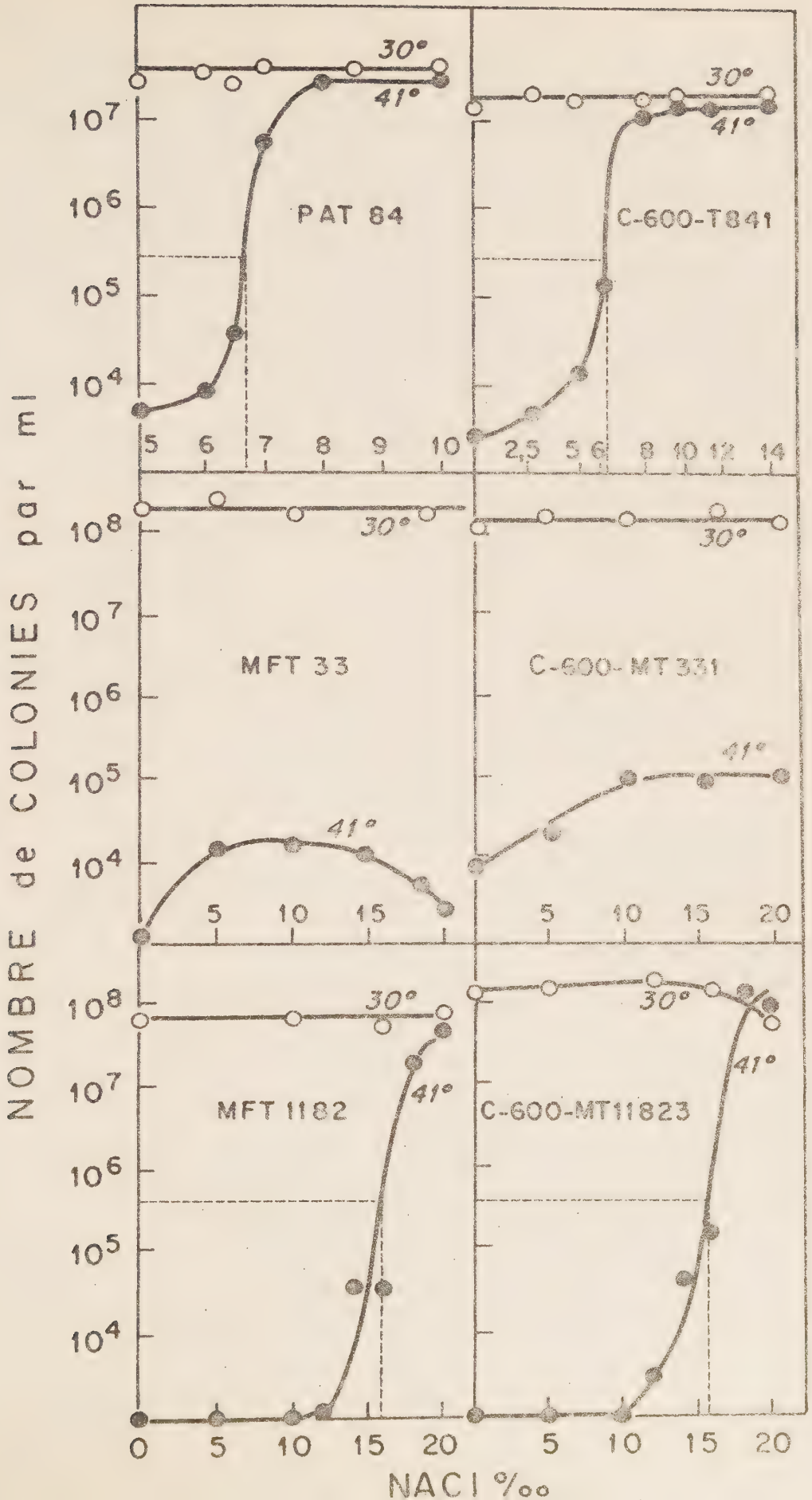
Hawthorne et Friis (1964) ont proposé une hypothèse qui permet d'expliquer les effets des sels et autres composés sur l'expression d'un grand nombre de mutations. Nos observations sont tout-à-fait en accord avec cette hypothèse.

Fig. 27. Etude de la capacité qu'ont les cellules de divers mutants appartenant au locus ftsA de former des colonies à 30° et à 41° en fonction de la concentration saline du milieu (ML) d'étalement.

C-600-T841 a reçu la mutation ftsA de PAT84 par transduction à l'aide du phage P_1

C-600-MT331 a reçu la mutation ftsA de MFT33
C-600-MT11823 a recu la mutation ftsA de MFT1182

On voit donc que l'effet du NaCl sur la thermosensibilité est spécifique de l'allèle considéré et non pas du gène.


NOMBRE de COLONIES par ml
PAT 84
C-600-T841
MFT 33
C-600-MT331
MFT 1182
C-600-MT11823
30°
41°
NACl ‰

D'après ces auteurs, les agents utilisés permettraient de corriger des mutations de type "faux-sens" qui se traduisent normalement par la synthèse de protéines modifiées fonctionnellement inactives. Agissant par voie osmotique, les sels et les sucres modifieraient la conformation de ces protéines de telle sorte qu'elles retrouvent leur activité.

Cette conclusion repose sur les faits suivants : parmi une importante série de mutants auxotrophes de la levure (231 mutants de types ade⁻ ileu⁻, his⁻ , tyr⁻, phe⁻, thr ⁻) il existe une corrélation négative absolue entre les mutants qui peuvent être réparés par la pression osmotique (37 mutants) et ceux qui sont suppressibles par les "super-suppresseurs" de la levure (suppresseurs de mutations "non-sens" 23 mutants). L'effet des sels ne s'exerce donc pas sur les mutations de type "non-sens".

Par ailleurs, si l'on examine les possibilités de complémentation intragénique chez ces divers mutants, on observe qu'une fraction élevée des mutants réparables par les sels sont susceptibles de complémenter, tandis qu'aucun mutant suppressible ("non-sens") ne complémente.

Enfin, si l'on ajoute qu'un nombre élevé de mutations réparables par les sels sont également thermoconditionnelles, il est raisonnable de penser qu'il s'agit de mutations de type "faux-sens", se traduisant par la synthèse d'une protéine modifiée et non pas de délétions ou de mutations "non-sens"

qui se traduiraient par l'absence de la protéine correspondante ou par la synthèse d'un fragment de celle-ci.

Les composés utilisés permettraient donc à la protéine altérée de reprendre une forme active.

Cette hypothèse permet d'expliquer l'ensemble des phénomènes observés par Hawthorne et Friis et par nous-mêmes. Notamment :

- le fait que le NaCl puisse corriger des mutants de types très divers (des mutations "faux-sens" pouvant intervenir dans n'importe quel gène).
- la spécificité à l'égard de l'allèle (c'est la nature de la mutation qui est déterminante et non pas celle du gène.)
- L'existence d'une concentration critique (voir p. 26) qui diffère d'un mutant à l'autre (les protéines mutées pouvant être altérées de diverses façons).
- la corrélation fréquente entre les effets du sel et de la température (ces facteurs pouvant l'un et l'autre agir sur la conformation des protéines).

Dans le cas des mutants que nous avons isolés, le fait qu'ils soient tous thermosensibles et que la souche parentale porte un suppresseur "amber" élimine pratiquement la possibilité d'obtenir des mutations de type "non-sens". On s'attend à ce que la majorité d'entre eux soient des mutants de type "faux-sens". Ceci expliquerait pourquoi nous trouvons une

fraction très élevée de mutants réparables par les sels ou les sucres (67%, voir p. 92).

Les divers composés utilisés dans ce but semblent, en première approximation, agir de façon osmotique. Les écarts observés entre les résultats et la théorie pouvant être expliqués par le fait que la membrane cellulaire n'est pas également perméable à ces composés et que d'autres facteurs, la force ionique notamment, peuvent interagir dans certains cas avec la pression osmotique pour favoriser ou défavoriser la restauration de l'activité de la protéine modifiée.

CHAPITRE 7

ISOLEMENT DE MUTANTS PRESENTANT DES ALTERATIONS AU NIVEAU DE LA MEMBRANE CELLULAIRE.

Introduction.

Nous avons vu, au cours de l'Introduction (p.I), quel pouvait être le rôle de l'enveloppe cellulaire en général et de la membrane cytoplasmique en particulier dans le déroulement du cycle cellulaire. Les hypothèses de Jacob, Brenner et Cuzin (1963) confèrent en effet à la membrane cytoplasmique un rôle privilégié dans la coordination des diverses étapes qui conduisent à la division cellulaire.

Ces hypothèses sont maintenant étayées par plusieurs types de faits expérimentaux, d'une part la mise en évidence de l'attachement du chromosome à la membrane (Ryter, 1968),

d'autre part, la présence d'altérations membranaires chez des mutants de type dnaA et dnaB (voir Introduction) et enfin par l'existence d'une zone de croissance privilégiée au sein de la paroi cellulaire (Ryter, Hirota et Schwarz p. VI

On peut inversement rechercher des mutants qui présentent des altérations de la membrane et considérer l'effet que ces altérations peuvent avoir sur le cycle cellulaire.

Il nous faut pour cela faire intervenir une fonction dont l'existence soit spécifiquement liée à celle de l'enveloppe cellulaire.

La première des fonctions assurée par l'enveloppe est d'établir une barrière de perméabilité entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Nous avons donc recherché des mutations qui se manifestent par une liberté de diffusion accrue pour des composés à l'égard desquels la membrane cellulaire est normalement imperméable.

Pour obtenir des mutants de ce genre, nous avons utilisé la souche PA505MB Δ ICIMH1 qui porte entre autres mutations deux délétions, lacy1 et malB Δ 101, qui abolissent la synthèse des perméases spécifiques du lactose et du maltose. En l'absence de transports actifs, la diffusion de ces deux composés au travers de l'enveloppe cellulaire est extrêmement faible.

Après mutagenèse de cette souche, nous avons recherché des mutants de phénotype lac^+ mal^+ chez lesquels un accroisse-

ment de la liberté de diffusion permet la pénétration du lactose et du maltose et leur utilisation par les enzymes cytoplasmiques.

D'après notre hypothèse, ces mutants doivent présenter des altérations au niveau de la membrane cellulaire. Outre leurs caractéristiques de perméabilité, nous avons donc examiné l'effet produit sur ces mutants par l'addition de déoxycholate de sodium et d'acide I-anilino-8-naphtalène sulfonique (ANS). Ces deux composés sont en effet connus pour agir au niveau de l'enveloppe cellulaire, le premier provoquant la lyse des cellules, le second provoquant une variation de l'intensité de fluorescence de la culture (cf. p. 52).

Le déoxycholate de sodium nous a également fourni la possibilité d'utiliser une deuxième méthode d'isolement de mutants de membrane, mutants qui sont caractérisés par leur incapacité de former des colonies sur des boîtes de milieux contenant 1% de déoxycholate de sodium.

1. Matériel et méthodes

1) Souches bactériennes :

Les mutants décrits dans ce chapitre ont été isolés à partir de la souche PA505MB Δ 101 MH1 (obligeamment fournie par le Dr. Hofnung) qui porte deux délétions *lacyl* et *malB*Δ101

ainsi que les mutations his, met, argH, thi et str. La liste des mutants est donnée dans le tableau 1d p. 2)

2) Test de crypticité :

Les souches à étudier sont tout d'abord cultivées pendant la nuit dans un milieu contenant de l'isophénylthiogalactoside IO^{-3} M (IPTG), analogue du lactose qui n'est pas métabolisé par la cellule.

La pénétration de l'IPTG est extrêmement réduite en l'absence de la perméase du lactose, mais elle suffit néanmoins à induire la synthèse de la β - galactosidase après un certain nombre de générations (une dizaine environ).

Les cellules en croissance exponentielle sont ensuite centrifugées, lavées une fois, et remises à croître dans du milieu frais pendant 1 ou 2 générations (cette opération permettant d'éliminer la β-galactosidase présente dans le milieu de culture).

On va finalement mesurer l'activité apparente de la β-galactosidase sur trois échantillons :

a) 1 ml de culture ayant subi 5 min. d'ébullition qui servira de témoin.

b) 1 ml de culture qui a été agitée 30 min. à 37° après avoir été traitée par le toluène (50 γ/ml) et par le déoxycholate de sodium (50 λ /ml d'une solution à 1%).

c) I ml de culture non traitée.

La mesure elle-même consiste à suivre spectrophotométriquement (à 420 mμ) l'apparition de la coloration jaune qui résulte de l'hydrolyse de l'orthonitrophényl - β -D-galactoside (ONPG) par la β-galactosidase. L'échantillon qui a subi l'ébulition sert de témoin pour la lecture spectrophotométrique.

A 1 ml d'échantillon, on ajoute 0,25 ml d'une solution d'ONPG à 0,4% et 1 ml d'une solution de tampon PM-2 additionné extemporanément de β -mercaptoéthanol (0,37 ml/50 ml). Le mélange réactionnel est incubé à 28° pendant un temps variable (de 1 min. à 60 min. selon la rapidité de la réaction), temps au bout duquel la réaction est arrêtée par l'addition de 0,5 ml d'une solution molaire de $-Na_2 10_3$.

Le "taux de crypticité" (Cohen et Monod, 1957) déduit de ces mesures est le rapport R des activités apparentes de la β -galactosidase de la suspension de cellules traitées par le toluène et de la suspension de cellules intactes, suspensions qui sont considérées comme les préparations enzymatiques.

Ces activités apparentes sont calculées comme suit :

$A = \frac{OD420}{OD550 \times t}$ ou $\underline{OD420}$ représente la densité optique (à 420 mμ) de la couleur jaune qui résulte de l'hydrolyse de l'ONPG, $\underline{t}$ (minutes) le temps pendant lequel on a laissé la réaction se poursuivre et $\underline{OD550}$ la densité optique (à 550 mμ) de la masse cellulaire de la culture utilisée.

l'ONPG, t (minutes) le temps pendant lequel on a laissé la réaction se poursuivre et OD550 la densité optique (à 550 mμ) de la masse cellulaire de la culture utilisée.

3) la pénétration du maltose a été mesurée suivant la méthode décrite par Schwartz (1967).

4) La méthode de mesure de la variation d'intensité de fluorescence après addition d'acide 1-anilino-8-naphtalène sulfonique a été exposée précédemment. (p. 9).

II. Résultats.

A) Isolement des mutants :

Les souches qui, à la suite d'une mutation présentent une perméabilité accrue à l'égard du lactose et du maltose ont tout d'abord été reconnues par la coloration des colonies formées à la surface de boîtes de milieu EMB lactose ou EMB maltose.

Le chromosome de la souche parentale utilisée, PA505MB Δ 101MH1 porte deux délections, lacyl et malB Δ 101 qui

abolissent les synthèses des perméases du lactose et du maltose. En l'absence de transport actif, les deux sucres ne peuvent donc pénétrer dans la cellule que très lentement et d'une façon purement passive. Sur milieu EMB contenant du lactose ou du maltose, cette souche forme des colonies de couleur claire, alors qu'une souche sauvage $\underline{lac}^+\underline{mal}^+$ forme des colonies de couleur noire.

Après mutagenèse, trois catégories de mutants ont été obtenues :

a) des mutants de phénotype $\underline{lac}^+\underline{mal}^-$ qui croissent sur milieu minimum contenant du lactose comme seule source de carbone et qui, sur milieu complet EMB lactose forment des colonies dont la coloration noire est comparable à celle d'une souche sauvage $\underline{lac}^+$ (3 mutants).

b) des mutants analogues aux précédents mais de phénotype $\underline{lac}^-\underline{mal}^+$ (3 mutants).

c) des mutants qui ont acquis en une seule étape génétique tout à la fois le phénotype $\underline{lac}^+\underline{mal}^+$ ainsi qu'une sensibilité accrue à l'égard du déoxycholate de sodium (caractère noté DEs).

Les 17 mutants de ce type qui ont été obtenus forment sur milieu complet EMB lactose ou maltose des colonies ayant une coloration intermédiaire entre celle de la souche parentale et celle d'une souche sauvage.

Sur milieu synthétique contenant du lactose ou du maltose comme seule source de carbone parmi 17 mutants, 10 dizaine forment des colonies avec la même vitesse qu'une souche sauvage. Les autres n'en forment qu'après un temps plus long (4 à 5 jours), temps après lequel la perméabilité passive suffit également à assurer la croissance de la souche parentale. Cette différence doit être rapportée aux différents niveaux de décryptification existant chez ces mutants.

C'est aux mutants de la catégorie C auxquels nous nous intéresserons dorénavant.

Les expériences décrites ci-dessous montreront que le phénotype lac$^+$ mal$^+$ de ces mutants est bien dû à une augmentation de la diffusion au travers de l'enveloppe cellulaire (phénomène de décryptification). Quelques autres propriétés de la membrane cellulaire de ces souches seront également examinées.

B - Mesure de la perméabilité des cellules à un analogue du lactose :

a) la souche parentale est extrêmement peu perméable à l'orthonitrophényl- β - D-galactoside (ONPG), analogue du lactose dont l'hydrolyse par la β - galactosidase se traduit par l'apparition d'une coloration jaune. Le système de transport actif du lactose étant absent, l'activité apparente de la

β - galactosidase que l'on peut mesurer avec une suspension lavée de cellules intactes est due à la pénétration des molécules d'ONPG au travers de la membrane par simple diffusion.

En revanche, en ajoutant du toluène (cf. Matériel et Méthodes) à la suspension bactérienne, les cellules deviennent totalement perméables à l'ONPG et l'on peut alors mesurer une nouvelle activité apparente de la β-galactosidase qui reflète le niveau d'induction de cet enzyme dans le cytoplasme.

Le rapport R des activités apparentes de la β -galactosidase avec ou sans traitement des cellules par le toluène est une méthode de l'imperméabilité cellulaire (taux de cryptocité). La méthode de calcul de ce rapport a été exposée dans la section matériel et méthodes. Sa valeur qui atteint environ 150 chez la souche parentale, est réduite de 2 à 20 fois chez les mutants. L'ensemble des résultats figurent dans le Tableau 24. Les activités spécifiques totales de la β-galactosidase, mesurées après traitement par le toluène étant sensiblement les mêmes que chez les mutants et chez la souche sauvage, la diminution du rapport R correspond donc bien à une augmentation de la diffusion de l'ONPG (décryptification).

b) Il importait de montrer que l'augmentation de l'activité mesurable de la β-galactosidase était bien le fait d'une

décryptification et non pas de la lyse d'une fraction des cellules.

Le tableau 25 montre que l'activité enzymatique du filtrat d'une culture est, dans les conditions expérimentales décrites précédemment (cf. Matériel et méthodes), inférieure au centième de l'activité mesurée avec la culture elle-même. Quant au rapport à des activités enzymatiques des cellules traitées par le toluène et des activités des filtrats, il est compris entre 1000 et 4000 chez les mutants comme chez le type sauvage.

En conclusion, la lyse des cellules intervient donc de façon négligeable dans la détermination du taux de crypticité des mutants.

En revanche, on remarque (Tableau 25) que lorsque la culture a été effectuée, non pas en milieu synthétique (M63), mais en milieu riche (ML), l'activité enzymatique dans le filtrat après 2 heures de culture est de 5 à 10 fois plus grande chez certains mutants que chez la souche parentale. Le marquage des cellules avec de l'Uracile-C-14 radioactif a montré que cet accroissement était dû à la lyse d'une faible fraction de la population et non pas à une excrétion de ß -galactosidase dans le milieu. C'est ainsi que dans le cas de la souche parentale, l'activité de l'enzyme et la radioactivité dans le filtrat augmentent après deux heures de

TABLEAU 24

Le rapport R est celui des activités apparentes de la β -galactosidase d'une suspension de cellules traitées par le toluène et d'une suspension de cellules intactes, que l'on considère comme des préparations enzymatiques. Ces activités sont elles-mêmes l'expression du rapport $\frac{OD420}{OD550 \times t}$ où OD420 représente la densité optique, à 420 mμ, de la couleur jaune résultant de l'hydrolyse de l'ONPG, t le temps (en minutes) pendant lequel on a laissé la réaction se poursuivre et OD550 la densité optique, à 550 mμ, de la masse cellulaire de l'échantillon de culture utilisé.

TABLEAU 25

Ce tableau montre le rapport des activités de la β-galactosidase mesurées, d'une part avec les cellules traitées par le toluène et, d'autre part, soit avec les cellules intactes (R cellules), soit avec un filtrat de la suspension de cellules intactes (R filtrat).

Tableau 24

Souche	Souche parentale PA505MB 101 MH1	PA505 LM3	PA505 LM6	PA505 ML10	PA505 LM14	PA505 LM17	PA505 LM51	PA505 LM53		PA505 LM71		PA505 LM83	PA505 LM92	PA505 LM106	PA505 LM115
								30°	40°	30°	40°				
Cellules intactes	0,0082	0,033	0,03	0,05	0,11	0,042	0,024	0,033	0,23	0,009	0,181	0,03	0,027	0,1	0,062
Cellules toluénisées	1,35	1,4	1,17	1	1,1	0,3	1,2	1	1,84	1,13	2	1,75	1,82	1	1,21
R	150	40	39	20	10	6,4	50	30	8	120	11	58	67	10	20

Tableau 25

Souche	Cellules intactes	Cellules toluénisées	Rc	Filtrat	Rf
PA505MB 101MH1					
milieu 63	0,0133	1,9	142	0,0001	2000
milieu L	0,0082	1,5	150	0,0001	1500
LM104					
milieu 63	0,181	1,96	10	0,0015	1000
milieu L	0,103	1,41	14	0,046	40
LM53					
milieu 63	0,12	2,85	22,5	0,001	2800
milieu L	0,129	2,12	16	0,038	60

culture, respectivement de 2,1 et de 1,6 fois, tandis que chez la souche LM53, l'activité de l'enzyme augmente de II,6 fois et la radioactivité de IO,6 fois. En milieu riche, la plupart des souches mutées sont donc plus fragiles que la souche parentale.

c) On peut également montrer que les mutations étudiées entraînent bien une décryptification et non pas l'utilisation d'un système de transport actif autre que ceux du lactose et du maltose.

Pour cela, on a ajouté au milieu réactionnel de l'azoture de sodium M/50 qui interdit tout transport actif en inhibant le transfert des liaisons riches en énergie. Il a été trouvé que cette addition n'avait aucune influence sur le phénomène observé. Dans le cas de la souche, on a mesuré un rapport R égal à 142 en l'absence d'azoture et à 145 en présence d'azoture ; tandis que chez les mutant PA5O5LM6, ces rapports étaient respectivement égaux à 39 et 41.

Les systèmes de transport actif au travers de l'enveloppe cellulaire n'interviennent donc pas dans l'expression du phénotype muté.

C) Sensibilité à l'égard du déoxycholate de sodium.

Quand on ajoute du déoxycholate de sodium (0,5% final) à une culture en phase exponentielle d'un mutant de phénotype lac$^+$ mal$^+$ (cf. § A-c), on observe une lyse des cellules qui est plus ou moins accentuée selon les souches. Ce phénomène a été constaté et étudié chez les mutants PA505LM3, 6, 16, 17, 106, 110 et 115. Des exemples sont représentés sur la fig.28.

En revanche, la souche parentale MHL$_1$, ainsi que les mutants de type lac$^+$ mal$^-$ (§ A-a et A-b) étudiés (L3 et L20) se sont révélés insensibles à l'action du déoxycholate de sodium 0,5% (fig.28).

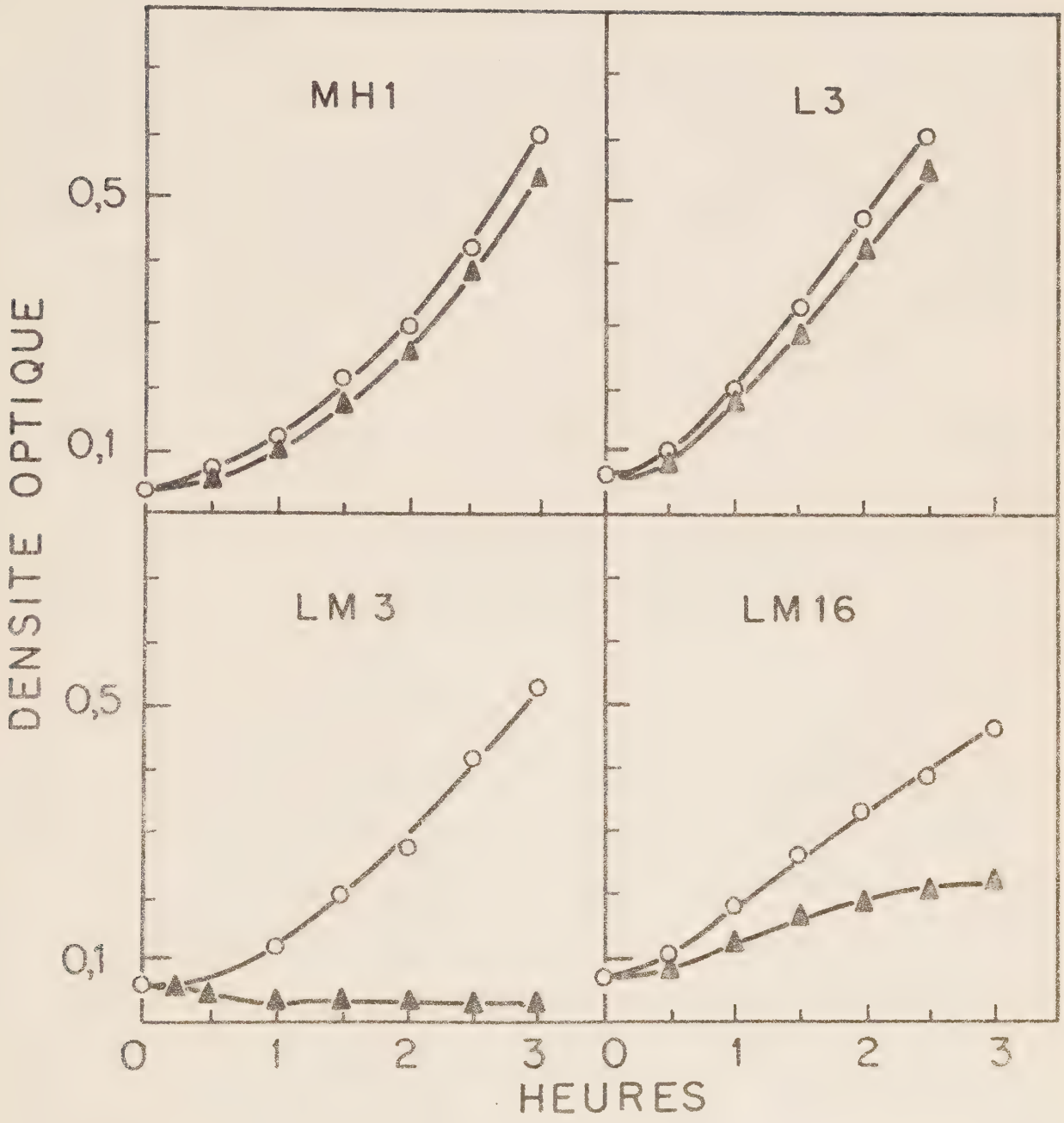
On sait que la sensibilité à l'égard du déoxycholate est généralement considérée comme le signe d'une altération de la membrane cellulaire. Elle a en effet été constatée précédemment chez divers mutants de membrane (Hirota, Wakil, Chapiro, Ryter, Hurwitz et Jacob, 1970 ; Henning, Rehn, Braun et Höhn, 1970) et chez des mutants tolérants à l'égard de la colicine (Nagel de Zwaig et Luria, 1967).

Les résultats obtenus renforcent donc l'idée suivant laquelle les mutants pléiotropes de type lac$^+$ mal$^+$ DEs sont des mutants de la membrane cellulaire.

Fig. 28. Sensibilité au déoxycholate de sodium (0,5% final)

La croissance et la lyse des souches étudiées sont suivies en mesurant l'évolution de la densité optique des cultures (absorption à 550 mμ dans des cuves de 0,5 cm de trajet optique) en absence (o—o) ou en présence de déoxycholate de sodium ajouté au temps zéro.

MH_1 est la souche parentale (PA505 MB Δ101 MH_1)
L3 est un mutant de phénotype lac^+, mal^- DE_S (catégorie I)
LM_3 et LM_{16} sont deux mutants de phénotype lac^+ mal^+ DE_S (catégorie III)


MH1
L3
LM 3
LM 16
0,5
0,1
DENSITE OPTIQUE
0
1
2
3
HEURES

D) Variation de la fluorescence consécutive à l'addition d'acide 1-anilino-8-naphtalène sulfonique (ANS) :

Le principe de cette étude a été exposé au chapitre 3. En ce qui concerne cette série de mutants, l'addition d'ANS à une suspension de cellules lavées ne provoque dans aucun cas un accroissement de fluorescence significativement supérieur à celui que l'on peut mesurer avec la souche parentale. Nous avons ainsi examiné les souches DE12, PA505LM3, 9, 16, 53, 71, 91, 101, 104, 106, 110 ainsi que PA505MBΔ101MH1 (tableau 26). Comme précédemment (p. 52), nous concluons donc que, chez ces mutants, les modifications de la membrane ne semblent pas entraîner une plus grande accessibilité de l'ANS à des sites hydrophobes masqués chez la souche parentale.

E) Aspects génétiques :

On peut penser que le phénotype lac$^+$ mal$^+$ DEs de ces mutants est bien acquis en une seule mutation, en effet :

a) nous avons obtenu des mutants thermoconditionnels qui sont de phénotype lac$^+$, mal$^+$, DEs à 41° et de phénotype lac$^-$, mal$^-$ DEr à 30° (les mutants LM31, LM82, LM92, LM102 et DE91).

b) Le caractère DEs est observé chez tous les mutants de phénotype lac$^+$ mal$^+$, mais chez aucun des mutants de type lac$^+$ mal$^-$ ou lac$^-$ mal$^+$.

TABLEAU 26

Ce tableau donne les valeurs dès la variation d'intensité de fluorescence N après addition d'ANS, calculée d'après la formule $N = (b-b_o)f - (a-a_o)$ dans laquelle b_o est l'intensité de fluorescence de la suspension bactérienne, b celle de la suspension bactérienne additionnée d'ANS 0,05 N final, a_o celle du tampon utilisé, a celle du tampon additionné d'ANS. Le facteur qui dépend de la densité optique de la suspension à 350 m μ est ici égal à 3,5.

Les valeurs de N ont été déterminées chez le type sauvage et chez les mutants à 30° ou à 37° et après 3 heures de culture à 41° dans le cas des souches de la série MFT. On considère que pour être significative, une différence doit au moins être un facteur 5 ou 10, ce qui n'est le cas d'aucune des souches examinées.

Tableau 26

	PA3092	MFT1	MFT1181	MFT84	MFT10338	MFT29	MFT100	MFT100	PAT42
30°	1,1	1,5	0,44	0,88	0,92	0,88	0,225	0,92	0,84
41°	1,25	1,7	0,86	0,9	1,2	1,4	0,29	0,94	1,05
	PA505MBΔ101MH1		LM2	LM9	LM16	LM153	L61	LM106	LM110	DE12
37°	0,46		0,73	0,37	0,41	0,66	0,28	0,50	1,34	0,14

La localisation génétique de ces mutations sur le chromosome bactérien n'a pas été étudiée.

F)Isolement de mutants sensibles au déoxycholate de sodium.

Dans le but d'obtenir des mutants dont la membrane cellulaire est altérée, nous avons également isolé directement une série de mutants sensibles au déoxycholate de sodium à haute température. Pour cela, des colonies provenant d'une culture mutagénisée par l'EMS ont été répliquée à 30° et à 41° sur des boites de milieu ML-O contenant 1% de déoxycholate.

De cette façon, nous avons obtenu, à partir de la souche PA5O5MBΔ1O1MH1, une série de mutants conditionnels, DE1, DE4, DE5, DE6, DE52, DE91 et DE1O3 qui sont sensibles au déoxycholate à haute température et résistants à 30°, ainsi que des mutants sensibles au déoxycholate à 30° comme à 41° (DE2, DE3, DE13). Deux d'entre eux (DE12 et DE1O3) présentent également un phénotype lac^+ mal^+ semblable à celui des mutants décrits précédemment. Les autres conservent le phénotype lac^- mal^- de la souche parentale.

Dans le cas du mutant thermoconditionnel DE1O3, le rapport R qui définit le taux de cryptocité à l'égard de l'ONPG est égal à 12 à haute température et à 52 à basse température (le rapport R étant égal à 14O chez la souche

parentale.

L'étude de la pénétration du maltose a également été étudiée chez ce mutant (cf.Matériel et Méthodes). Il a pu être montré que, à 41° dans un intervalle de 30 min., le mutant incorporait trois fois plus de maltose ^{14}C que la souche parentale (1137/320 cpm, valeurs rapportées à des masses cellulaires identiques).

Conclusion :

Il est raisonnable de penser que les mutants pléiotropes que nous venons de décrire sont effectivement des mutants de la membrane cellulaire. Les modifications de la barrière de diffusion et la sensibilité accrue à l'égard d'un détergent, le déoxycholate de sodium, trouvent là en effet leur explication la plus simple. Nous disposons donc maintenant d'une collection de 27 mutants indépendants dont la membrane cellulaire est altérée.

Toutefois ces altérations, quel que puisse être leur intérêt par ailleurs, ne perturbent pas de façon significative le déroulement du cycle cellulaire. Ces mutants sont viables, se multiplient normalement et ne forment pas de cellules filamenteuses.

La membrane cellulaire pourrait donc subir des modifications de structure d'une certaine importance et continuer toutefois à assurer la fonction régulatrice que lui attribue le modèle du réplicon.

RESUME ET DISCUSSION

Nous résumerons tout d'abord les principaux résultats acquis au cours de notre travail.

Notre propos était d'étudier les étapes finales du cycle de division cellulaire, étapes qui après la réplication du DNA consistent en la répartition des noyaux et la formation du septum intercellulaire. Pour cela nous avons entrepris d'isoler une série de mutants conditionnels thermosensibles qui ont perdu la faculté de se diviser à haute température. C'est ainsi que nous avons obtenu 80 mutants indépendants qui sont incapables de former des colonies à 41° sur des boîtes de milieu complet. Parmi ces 80 mutants,26 continuent à croître après l'arrêt de la division et forment de longues cellules filamenteuses. Ils renferment donc une altération au niveau d'une fonction qui est impliquée directement ou indirectement dans le mécanisme de la division.

Nous avons tout d'abord examiné la morphologie de ces mutants par des techniques de coloration nucléaire et

de microscopie électronique. Cet examen a permis de reconnaître trois types de mutants :

a) des mutants dont les noyaux ne se multiplient plus (type dna)

b) des mutants dont les noyaux se multiplient mais ne peuvent être séparés et distribués normalement (type par)

c) des mutants qui synthétisent et répartissent leurs noyaux, mais qui sont incapables de former des septa intercellulaires (type fts).

L'inhibition de l'une quelconque des diverses fonctions de type dna, par et fts se traduit donc à brève échéance par l'arrêt de la division cellulaire. Dans les deux premiers cas, cet arrêt semble être un effet secondaire de l'arrêt de la synthèse du DNA ou de la répartition des chromosomes, tandis que dans le dernier cas, c'est le mécanisme de formation du septum qui semble touché plus directement.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressé aux mutations de type par et surtout de type fts qui affectent les étapes finales de la division.

Le nombre des fonctions touchées par les mutations étudiées a pu être déterminé par l'étude génétique. C'est ainsi que nous avons identifié et localisé deux locus de type par (parA et parB) et sept locus de type fts (ftsA

à ftsG) parmi lesquels seuls deux locus étaient déjà connus (ftsA et ftsB). Cette étude a comporté pour l'ensemble des mutants l'analyse de croisements, de transductions variées et de tests de dominance. La plupart de ces mutations ont pu être localisées avec une précision correspondant à 1 min. de la carte chromosomique d'E.coli (Taylor, 1970). Les tests de dominance ont montré que toutes les mutations examinées étaient récessives par rapport aux allèles sauvages, à l'exception des mutations de type ftsD, qui sont dominantes.

En ce qui concerne les mutants de type fts, il est remarquable de constater que parmi seulement 16 mutants localisés avec précision, il a été trouvé 7 gènes distincts. Ceci indique d'une part qu'il existe un nombre élevé de fonctions dont l'altération se traduit par la formation de filaments multinucléés et d'autre part que l'on doit s'attendre à identifier de nouveaux gènes fts en analysant une nouvelle série de mutants.

L'étude physiologique que nous avons entreprise ensuite permet de s'interroger sur la nature des fonctions mutées. Nous envisagerons successivement l'étude des mutants de type fts, ceux de type par et des mutants reverses thermorésistants qui en ont été obtenus.

1. Mutants de type fts.

Les mutants de type fts que nous avons isolés cessent immédiatement de se diviser dès qu'on les porte à haute température (41°C). Chez les cellules filamenteuses qui se forment, les principales synthèses macromoléculaires examinées (masse cellulaire, DNA, RNA, muréine de la paroi) se poursuivent normalement à 41° pendant au moins 60 min. La survie des cellules commence ensuite à décroître de façon exponentielle après un temps d'incubation qui varie suivant le type de mutant. L'inhibition de la division cellulaire n'est donc pas un effet secondaire de l'arrêt de l'une de ces synthèses macromoléculaires.

Si maintenant, on examine en détail la survie à 41° du "potentiel de division" qui permet aux cellules filamenteuses de se diviser à nouveau lorsqu'on les ramène à 30°, des différences apparaissent entre les mutants que l'on peut ranger en plusieurs catégories :

a) des mutants de type ftsA et ftsE sont capables de se diviser rapidement à 30° après une incubation prolongée à 41° (60 min. à 120 min.) sans que de nouvelles synthèses protéiques soient nécessaires. L'inactivation thermique des produits des gènes ftsA et ftsE est donc réversible. Les filaments ramenés à 30° se segmentent de telle sorte que le nombre de cellules devient rapidement égal à celui

d'une culture témoin gardée à 30° depuis le début de l'expérience.

On peut interpréter ce phénomène de deux façons :

1) L'inactivation thermique des produits de ces gènes reste reversible suffisamment longtemps pour que ces produits puissent reprendre en quasi totalité une forme (conformation) active à 30°. Des septa sont alors rapidement formés tout au long du filament à des distances qui correspondent à la taille d'une cellule normale.

2) D'après Reeves, Groves et Clark (1970) qui ont étudié quelques propriétés du mutant BUG-6 lequel possède des caractéristiques comparables à celles des mutants ftsA et B, le "potentiel de division" ne resterait sous une forme inactive reversible que pendant un court laps de temps à 41° (quelques minutes). En revanche, il serait synthétisé en quantité accrue, le système de régulation correspondant étant déréprimé.

Il n'est guère possible à l'heure actuelle de trancher entre ces deux types d'hypothèses.

b) Les mutants de type ftsD sont capables de se diviser à 30° après 60 min. d'incubation à 41°, mais contrairement au cas précédent, les synthèses protéiques de novo sont nécessaires pour que cette restauration puisse s'effectuer. Il faut donc que les éléments altérés soient remplacés ou

dilués par la synthèse d'éléments fonctionnels. On sait par ailleurs que les mutations de type ftsD sont dominantes par rapport à l'allèle sauvage. La fonction ftsD semble donc être d'un type différent de celui des autres fonctions fts.

On peut imaginer notamment que le produit du gène ftsD puisse être soit un élément d'une structure qui participe au processus de la division (membrane, site d'invagination du septum, paroi), l'insertion d'éléments altérés rendant cette structure inopérante, soit une protéine régulatrice qui à l'état muté se comporterait à la manière d'un super-suppresseur.

L'étude des caractéristiques de la paroi et de la membrane cytoplasmique de ces mutants pourrait permettre d'examiner la validité de la première hypothèse.

c) Les mutants de type ftsB, ftsC, ftsF et ftsG perdent rapidement à 41° la faculté de se diviser à basse température. Le potentiel de division de ces cellules est donc inactivé de façon irréversible durant les 60 premières minutes d'inactivation à 41°.

La variété de ces phénotypes mutés reflète donc la variété des altérations qui peuvent provoquer l'arrêt de la division. A la fin de cet exposé, nous discuterons des diverses causes que l'on peut envisager pour expliquer ce

phénomène.

Nous avons vu également que d'après le modèle du réplicon (Jacob et Col.1963) et les expériences qui y ont fait suite (cf.notre Introduction), la membrane cytoplasmique pourrait jouer un rôle-clé dans la régulation du cycle cellulaire. Nous avons examiné quelques unes des propriétés de la membrane et de la paroi de nos mutants sans toutefois pouvoir y déceler une altération quelconque. Les caractères examinés ont été :

1) La sensibilité au déoxycholate de sodium, qui est souvent associée aux mutations de membrane (Nagel de Zwaig, et col., 1967; Hirota et col, 1970 ; Ricard et col.,1970; Henning et col., 1970) ;

2) La variation de fluorescence qui suit l'addition d'acide 1-anilino-8-naphtalène sulfonique (ANS). Une variation importante indiquerait une modification de structure de la membrane telle que l'ANS puisse accéder plus facilement à des sites protéiques hydrophobes normalement masqués chez la souche parentale (Weber et col.,1964 ; Hirota, Wakil et col., 1970).

L'observation en microscopie électronique de coupes minces de nos mutants n'a également révélé aucun défaut de structure apparent (Dr. A. Ryter).

L'étude de l'enveloppe cellulaire des mutants de division a été poursuivie par l'examen d'enzymes de la

paroi. En effet, la cellule qui est entourée d'une paroi rigide formée d'une macromolécule unique de muréine, doit pour se diviser créer une brèche dans cette enveloppe (Schwartz et Leutgeb; 1970). C'est le rôle d'un certain nombre d'hydrolases qui sont actuellement en cours de purification.

Subséquemment des synthétases permettent l'insertion de nouveaux matériaux dans la molécule de muréine. Il est donc très vraisemblable que certains de ces enzymes sont directement impliqués dans le processus de division. C'est ce qui a été examiné en collaboration avec les Drs Schwarz et Van Heigenort. Les activités de diverses endopeptidases et glucosidases de la muréine ont été mesurées chez les mutants de type fts. La difficulté de ces mesures tient à l'existence de plusieurs enzymes qui exercent une action similaire sur les substrats utilisés. De fait, jusqu'à maintenant, aucune altération n'a pu être mise en évidence de façon très nette chez les mutants étudiés. Cependant, les méthodes expérimentales qui sont mises au point à l'heure actuelle devraient permettre de préciser des résultats préliminaires qui indiquent que l'une des hydrolases de la muréine est thermosensible chez le mutant MFTIC8, le seul connu au locus ftsC.

Une autre manière d'examiner les caractéristiques

de la paroi cellulaire de nos mutants consiste à mesurer leur degré de sensibilité à l'égard de la pénicilline G. On sait qu'à diverses concentrations, la pénicilline peut provoquer tout d'abord l'arrêt de la division cellulaire et la formation de cellules filamenteuses (20 u/ml) puis l'arrêt de la croissance et la lyse des cellules (100 u/ml) Cette action s'exerce en fait sur deux cibles : une endopeptidase de la muréine (pour les faibles doses) et une glucosidase de la muréine également (pour les doses élevées). Dans les deux cas, c'est donc au niveau de la paroi que la pénicilline agit (Hartmann et col., 1972).

De fait, les effets de la pénicilline G sur nos mutants de division ont permis la mise en évidence de différences très nettes entre ces mutants : les mutants de type ftsA, ftsB, ftsD, ftsF et ftsG présentent une résistance nettement accrue à l'égard de la pénicilline, tandis que les mutants de type ftsC, ftsE et parB ont une sensibilité similaire à celle de la souche parentale.

Il en a été déduit que les mutations ftsA, B, D, F et G entrainaient directement ou indirectement des modifications de l'enveloppe cellulaire telles que la pénicilline n'était plus en mesure d'exercer son action sur la molécule de muréine.

Il n'est pas que la membrane et la paroi qui soient susceptibles de régler le déroulement du cycle cellulaire.

Il ne fait pas de doute que de nombreuses autres fonctions interviennent dans ce processus. L'existence notamment de relations entre la fonction recA, l'induction de la multiplication du prophage λ et la division cellulaire a été soulignée par divers auteurs (cf. chapitre III).

Nous avons montré que si ces relations existaient, elles ne se manifestaient que dans certains cas particuliers. En effet, parmi notre collection de mutants de division qui forment des filaments à haute température, on n'en trouve aucun qui induise la multiplication du prophage λ ou qui puisse être corrigé par la mutation recA.

Nous avons également eu la possibilité d'étudier certaines des interactions qui relient la division à d'autres fonctions cellulaires, en isolant des mutants reverses thermorésistants à partir des mutants de division.

On trouve, en effet, parmi ces mutants reverses des souches qui ont acquis le caractère thermorésistant à la suite d'une mutation secondaire qui altère une fonction autre que la fonction originellement mutée.

Nous avons observé notamment que la thermorésistance était fréquemment associée à une sensibilité accrue au rayonnement ultraviolet ou à une plus grande résistance à la mitomycine C. Il est difficile toutefois de déterminer le niveau auquel se situent ces interactions fonctionnelles dans la succession des étapes qui vont de la synthèse

du DNA à la séparation des cellules. En effet, si l'on considère généralement que la cible des rayons UV et de la mitomycine est le DNA, il a été également montré que la mitomycine C pouvait aussi exercer une action sur l'enveloppe cellulaire (Henning et col., 1972). On peut donc tout aussi bien envisager que les mutations reverses étudiées agissent sur un mécanisme régulateur qui coordonne la réplication du DNA et la division, ou bien sur la structure de la paroi et du septum intercellaire.

Les réactions mises en jeu sont donc multiples et complexes. Nous avons vu qu'il existait au moins sept gènes dont la mutation se traduit par la formation de cellules filamenteuses multinucléées dont les caractéristiques physiologiques variées ne sont pas encore suffisamment spécifiques pour pouvoir définir la nature exacte de la fonction mutée. De nombreuses causes peuvent à priori engendrer un tel phénotype, nous les décrirons en fin d'exposé et envisagerons les moyens qui permettraient de les vérifier par l'expérience.

II. Mutants de type par.

Parmi les 26 mutants nouvellement isolés qui forment des filaments à haute température, se trouvent deux mutants de type par. Ce phénotype muté est essentiellement reconnu

à sa morphologie. C'est grâce aux techniques de coloration nucléaire que l'on peut voir en effet que chez ces mutants les noyaux synthétisés à 41° ne se séparent pas et forment une masse nucléaire au centre du filament. La division cellulaire s'en trouve arrêtée, ce qui montre bien que la répartition régulière des noyaux est indispensable à l'expression de la division.

Parmi ces mutants, MFT110 et MFT100, nous avons reconnu l'existence de deux gènes distincts, parA, qui est cotransductible avec le locus purA, et parB qui se trouve à proximité du locus metC . Un mutant de type parA,PAT32, ayant été décrit par ailleurs (Hirota, Ryter et Jacob, 1968), nous avons étudié principalement le mutant MFT100.

A 41°, ce mutant cesse de répartir les chromosomes qu'il synthétise et ne se divise plus. La croissance se poursuivant, il se forme donc des filaments qui atteignent une taille supérieure à ceux des mutants de type parA chez qui les synthèses macromoléculaires s'arrêtent assez rapidement. Chez le mutant MFT100 en effet, les synthèses macro-moléculaires se poursuivent normalement à 41° pendant au moins 60 min., temps au bout duquel les cellules filamenteuses formées sont capables de se diviser à nouveau à 30°, même si l'on inhibe les synthèses protéiques. Ce mutant est normalement sensible à la pénicilline, n'induit pas la multiplication du prophage

à 41° et n'est pas modifié par l'introduction de la mutation recA.La nature de la lésion biochimique qui provoque l'arrêt de la partition est inconnue.

Ce mutant nous a permis d'étudier un aspect intéressant de la régulation du processus de division.

Nous avons en effet isolé une classe de mutations, nommées divC, qui permettent à la septation de reprendre sans que la partition nucléaire soit restaurée. Une mutation div affecterait donc la ou l'une des fonctions qui coordonne la partition et la division. D'autres types de mutation div sont connues (divA et divB, Hirota,et col. I968) ; Hirota et Ricard, I972). Quant aux mutants de type divC, ils ont été obtenus en sélectionnant des souches résistantes à la mitomycine à partir du mutant MFT100. Cette sélection a été suggérée par les effets de ce composé sur le DNA et sur la paroi cellulaire (cf. chapitre V). Outre I8 mutants de type parB-divC nous avons obtenu de la même manière 6 mutants de type dnaB-divC.

L'étude des propriétés de la membrane cytoplasmique et de la paroi revêt un intérêt particulier dans le cas des mutants de partition. En effet, d'après le modèle de Jacob, Brenner et Cuzin (1963), c'est par la croissance de l'enveloppe au niveau de l'équateur de la callule que

les chromosomes attachés à la membrane se séparent les uns des autres et sont répartis entre les cellules filles. Nous avons vu (chapitre III) que les caractéristiques du mutant MFTICO (et notamment la reversibilité de l'inactivation thermique) suggèrent que la mutation parB pourrait altérer le mécanisme de croissance zonale de l'enveloppe, et non point l'attachement des chromosomes à la membrane. Il est maintenant possible de vérifier ce point grâce à la technique de marquage bref de la muréine de la paroi suivi d'une autoradiographie, qui a été mise au point récemment par Ryter, Hirota et Schwarz.

On pourrait s'attendre à observer le remplacement du mode de croissance zonale par une croissance homogène ou par une croissance zonale non équatoriale. L'analyse des protéines membranaires et des composants de la paroi pourrait faire suite à cette expérience si le résultat en était positif.

Outre les mutations de types par et div, nous avons également étudié une mutation de type minA, dont nous avons précisé la localisation génétique (entre les locus tsx et gal).

Un mutant min produit des mini-cellules sphériques de I µ de diamètre qui peuvent être formées en tout point de filament. Les divisions qui les engendrent demeurent sous

le contrôle du cycle de réplication du DNA (Clark, 1968). Si une mutation div provoque la ségrégation de cellules de taille normale, en revanche une mutation min semble altérer un mécanisme qui détermine la position du septum, probablement par rapport aux extrémités de la cellule.

A la fin de cet exposé, nous tenterons de rassembler tous les éléments qui viennent d'être décrits pour donner une vue d'ensemble du cycle cellulaire. Auparavant, nous voudrions résumer deux autres chapitres de notre travail qui n'ont pas un rapport direct avec notre étude de la division cellulaire et qui ont trait, l'un à l'effet des sels sur l'expression de diverses mutations et l'autre à la constitution d'une collection de mutants de membrane.

III. Effet des sels sur l'expression phénotypique de diverses mutations.

Nous avons trouvé que l'augmentation de la concentration du milieu de culture en sel ou en sucre pouvait rendre phénotypiquement normaux un grand nombre de mutants d'Escherichia coli K12. C'est ainsi que l'on peut rétablir la division cellulaire, la synthèse du DNA et la résistance aux rayons UV respectivement chez des mutants de type fts, dna, uvrC et urt.

Cet effet qui a été mis en évidence chez des mutants

de types très variés est une caractéristique de l'allèle muté et non pas du gène lui-même. En d'autres termes, c'est la nature de la mutation et non pas celle de la fonction mutée qui détermine la réponse à l'égard des sels.

L'ensemble de nos observations , que nous ne rappellerons pas ici, concordent avec celles que Hawthorne et Friis (1964) ont effectuées sur des mutants auxotrophiques de la levure. L'hypothèse qui ressort de ces observations est que les sels et les sucres corrigent les effets de mutations de type "faux-sens" probablement en modifiant par voie osmotique la conformation de la protéine inactive produite par ces mutations (chapitre VI).

IV. Mutants présentant des altérations de la membrane

Il est apparu digne d'intérêt d'isoler une série de mutants présentant des altérations de la membrane cellulaire et d'examiner leurs propriétés. On pourrait s'attendre en effet d'après le modèle de replicon à ce que certains types de modification de la membrane entrainent des perturbations dans le cycle cellulaire.

La perméabilité cellulaire est la principale fonction dont on sache avec certitude qu'elle est assurée par la membrane cytoplasmique. Nous avons donc isolé des mutants qui possèdent une liberté de diffusion accrue pour

des composés auxquels la membrane est normalement imperméable. C'est ainsi qu'à partir d'une souche portant des délétions dans les gènes des perméases du lactose et du lacy.$^-$ et mal$_B^-$), nous avons obtenu des mutants qui en une seule étape génétique avaient acquis le triple phénotype lac$^+$, mal$^+$ et DBs (sensibilité au déoxycholate de sodium).

Nous avons montré en mesurant le taux de crypticité (c'est-à-dire le taux d'imperméabilité) de ces mutants que ce phénomène était bien dû à une "décryptification" et non pas à l'utilisation d'un nouveau système de transport actif ou encore à la lyse des cellules. De plus, la sensibilité au déoxycholate de sodium est généralement considérée comme le signe d'une altération de la membrane (Nagel de Zwaig et col. I967 ; Hirota, Wakil et col., I970 ; Ricard et col., I970 ; Henning et col., I970)

En revanche, les altérations étudiées n'entraînent pas de modifications de structure telles que l'accès d'un colorant fluorescent (l'acide-1-anilino-8-naphtalène sulfonique (ANS) aux sites protéiques hydrophobes de la membrane s'en trouve modifiée.

Nous avons également augmenté la collection de mutants de membrane décrite ci-dessus d'une série de souches isolées directement pour leur sensibilité au déoxycholate de sodium. Certains de ces mutants présentent comme les

précédents une perméabilité accrue au lactose et au maltose (chapitre VII).

Si ces mutants pouvaient permettre, à l'issue d'une étude génétique, d'identifier un ou plusieurs gènes concernant la structure de la membrane, en revanche, ils n'apportent guère d'informations sur le cycle cellulaire puisqu'ils croissent et se divisent normalement.

CONCLUSION

Qu'avons-nous appris et que peut-on espérer de l'étude des mutants de division que nous avons isolés ?

Résumons tout d'abord le cycle de division cellulaire tel que l'on peut se le représenter à l'heure actuelle : après avoir été déclenchée par l'expression d'au moins deux gènes (dnaA et dnaC, Gross, 1971), la réplication du DNA se poursuit jusqu'à son terme. Pour cela, quatre gènes au moins doivent être exprimés (dnaB, dnaD, dnaE et dnaG ; Gross I971), l'un d'eux (dnaE) codant pour la DNA polymerase III (Gefter et col. 1971). Vers la fin de la duplication du chromosome, il est émis un signal qui est nécessaire à l'expression de la division (Clark, I968 ; Helmstetter et Pierucci, I968). Le temps qui

s'écoule ensuite entre la fin de la réplication du DNA et la division semble être une constante (Cooper et Helmstetter I968).

Puis interviennent deux fonctions parA et parB, qui assurent la séparation et la répartition des noyaux. Un défaut de partition entraîne également l'arrêt de la division. La régulation qui est mise en jeu à ce niveau pourrait être assurée en partie par les gènes de types div dont la mutation permet aux cellules de se diviser en l'absence de partition. Puis la cellule en vient à la division proprement dite, ce qui implique l'intervention d'au moins sept gènes de type fts (ftsA à G), en l'absence desquels aucun septum n'est formé.

Il est tout-à-fait certain que le cycle cellulaire comporte d'autres étapes que celles que nous venons de citer. Toutefois, à une exception près, celle du gène dnaE, la nature biochimique des fonctions exprimées par ces gènes, demeure totalement inconnue. C'est donc uniquement grâce à l'analyse génétique que l'on a pu reconnaître l'existence et l'identité d'une quinzaine de ces fonctions. Cette voie d'accès ne semble pas encore close puisque dans le cas des mutants de type fts par exemple, nous avons identifié 7 locus parmi seulement 16 souches. L'analyse génétique d'une nouvelle série de mutants devrait donc permettre

d'identifier de nouveaux gènes de ce type.

Quant aux lésions biochimiques des mutants de division, on peut s'interroger sur leur nature en examinant les causes qui pourraient à priori provoquer l'arrêt de la division et en considérant des moyens qui permettraient de les étudier. Ces lésions peuvent être réparties entre trois types :

1) Altération d'un mécanisme de régulation.

La caractérisation de gènes régulateurs requiert outre une analyse génétique, la possibilité de mesurer l'activité de ces gènes d'une façon plus précise que d'examiner simplement la présence ou l'absence de division. Quoique l'analyse des mutants de division n'en soit pas encore arrivée à ce stade, l'existence de plusieurs éléments régulateurs semble avoir été mise en évidence (influence de la fin de la réplication du DNA et de la partition des noyaux) sur la division, mutations div.)

Nous avons vu également que selon le modèle du replicon, certains des mécanismes régulateurs de la division pourraient avoir leur siège dans la membrane (Jacob et coll. I963). De fait des altérations de membrane ont déjà été décelées chez des mutants de DNA qui cessent également de se diviser (Inouye et Guthrie, I969 ; Shapiro et col. I970). Il serait donc intéressant d'analyser les protéines

membranaires des mutants des types parA et B et ftsA à ftsG.

2) défaut biochimique.

L'absence d'un enzyme ou d'un composé quelconque intervenant dans le processus de division peut évidemment se traduire par l'arrêt de cette dernière. Il serait vain de vouloir envisager toutes les éventualités possibles en ce domaine. Parmi les quelques sujets d'étude qui s'offrent à l'heure actuelle, citons l'étude des enzymes hydrolytiques de la paroi dont certaines doivent nécessairement intervenir au moment de la formation du septum et de la séparation des cellules. Des résultats préliminaires positifs ont déjà été obtenus (chapitre III). Les progrès accomplis dans l'étude des synthétases de la paroi devraient également permettre dans un proche avenir de mesurer l'activité de ces enzymes chez les mutants de division.

3. Défaut de structure.

Si la membrane ou la paroi par exemple possèdent une constitution chimique normale mais une structure incorrecte, on peut imaginer que la division cellulaire s'en trouve bloquée. La mise en oeuvre de structures spécifiques semble notamment nécessaire en ce qui concerne le processus de croissance zonale de l'enveloppe et la détermination du site d'invagination du septum.

Une tentative a été faite pour déceler des altérations de la structure membranaires des mutants de division en mesurant la fixation d'un colorant fluorescent, l'ANS, sur les sites protéiques hydrophobes de la membrane. Il pourrait être intéressant d'appliquer à l'étude de ces mutants d'autres méthodes physicochimiques.

Du point de vue biochimique, les expériences de Ryter, Hirota et Schwarz qui montrent, par le marquage bref de la muréine, que la zone de la croissance de la paroi est localisée en permanence au niveau de l'équateur de la cellule, vont être étendues à l'ensemble des classes mutées de type par et fts.

Dans le cas de mutants de type par notamment, on pourrait s'attendre à observer des perturbations dans le mode de croissance zonale, perturbations qui expliqueraient le défaut de partition des noyaux.

On voit donc que tant du point de vue de la génétique que de la biochimie, l'étude des mutants de division que nous avons isolés offre encore des possibilités variées.

Parmi les expériences qui pourraient être entreprises dans l'immédiat, citons : l'identification de nouveaux gènes de type par et fts. La réalisation de tests de complémentation qui pourraient permettre de reconnaître l'existence éventuelle de groupes de gènes au sein des locus que nous

avons identifiés. La construction de double mutants fts-fts par-par et fts-div dont l'étude morphologique et physiologique pourrait livrer quelques informations sur l'agencement du cycle cellulaire et suggérer de nouvelles expériences.

L'étude des enzymes de la paroi cellulaire et du mode de croissance de cette dernière chez le type sauvage et chez les mutants, l'analyse comparée des protéines membranaires par électrophorèse sur gel. Restent les problèmes concernant les mécanismes de régulation de la septation. Leur étude reste d'un accès difficile et il faudrait pour pouvoir les résoudre connaître tout d'abord les produits des divers gènes analysés.

BIBLIOGRAPHIE

ADELBERG, E.A. et S.N.BURNS, 1960. Genetic variation in sex factor of Escherichia coli. J. Bact. 79 : 321-330.

ADLER, H.I. et A.A. HARDIGREE, 1964. Analysis of gene controlling cell division and sensitivity to radiation in Escherichia coli. J.Bact. 87 : 720 - 726.

ADLER, H.I., FISHER, W.D., COHEN, A. et A.A. HARDIGREE 1967. Miniature Escherichia coli cells deficient in DNA. Proc.Natl. Acad. Sci. 57 : 321-326.

BABINET, C., 1971. Propriétés de dominance de quelques mutations conférant la résistance à la rifamicine chez E.coli K12. Biochimie. 53 : 507-516.

BAYER ,M.E., 1968. Areas of adhesion between wall and membrane of Escherichia coli. J. Gen.Microbiol. 53 : 395-404.

BOYCE R.P. et P. HOWARD-FLANDERS. 1964. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in E.coli K12 Proc.Natl.Acad.Sci. 51 ; 293-300.

BRICE. C.B. et H.L. KORNBERG, 1967. Location on the chromosome of Escherichia coli of a gene specifying phosphopyruvate synthetase activity. Biochem.Biophys.Acta 136 : 412-414.

BRILES, E.et A. TOMASZ, 1970. Radioautographic evidence for equatorial wall growth in a Gram-positive bacterium. Segregation of choline ^{3}-H labeled techoic acid.J.cell.Biol. 47 : 786-790.

CARL, P.L. 1970 - Escherichia coli mutants with temperature sensitive synthesis of DNA. Molec.Gen.Genetics 109 : 107-122.

CLARK, J. 1968. Regulation of deoxyribonucleic acid replication and cell division in Escherichia coli B/r.J.Bact. 96 : 1214-1224.

CLARK, J.et A.D. MARGULIES, 1965. Isolation and characterization of recombination deficient mutants of Escherichia coli K12. Proc.Natl.Acad.Sci. 53 : 451-459.

COHEN.G.et J.MONOD. 1957. Bacterial permeases. Bact. Rev. 21 : 169-194.

COOPER, S. et C.E. HELMSTETTER. 1968. Chromosome replication and the division cycle of Escherichia coli B/r. J. Mol.Biol. 31 : 519-540.

FIELDING, P. et F. FOX, 1970. Evidence for stable attachement of DNA to membrane at the replication origin of Escherichia coli. Biochim.Biophys.Commun. 41 : 157-162.

FRYE, C.D. et M. EDIDIN. 1970. J.cell. Science 7 : 313.

FUCHS, E. et P. HANAWALT, 1970. Isolation and characterization of DNA replication complex from Escherichia coli. J.Mol.Biol. 52 : 301-322.

GANESAN, A.T., 1968. Studies in vitro replication of Bacillus subtilis DNA. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 33 : 45-57.

GANESAN, A.T. et J. LEDERBERG. 1965. A cell-membrane bound fraction of bacterial DNA. Biochem.Biophys.Res.Commun. 18 : 824-835.

GEFTER, M.L., HIROTA, Y., KORNBERG, T., WECHSLER, J.A. et C.BARNOUX 1971. Analysis of DNA polymerase II and III in mutants of Escherichia coli thermosensitive for DNA synthesis. Proc. Natl.Acad.Sci. 68 : 3150-3153.

GOSS, N., DEITZ, W. et T.COOK, 1964. Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli. J. Bact. 88 : 1112-1118.

GREEN, M.H.L., GREENBERG, J. et J. DONCH, 1970. Effect of recA gene on cell division and capsular polysaccharide production in a lon strain of Escherichia coli. Gent.Res.Camb. 14 : 159-169.

GROSS, J. 1971, DNA replication in bacteria. In "Current topics in Microbiology and Immunology", Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg and New-York.

HARTMANN, R., HOLTJE, J.V. et U. SCHWARZ. 1972. Targets of penicillin action in Escherichia coli. Nature 235 : 426-429.

HATFIELD, D., HOFNUNG, M. et M. SCHWARTZ, 1969. Genetic analysis of the malA region in Escherichia coli. J. Bact. 98 : 559-567.

HAWTHORNE, D.C. et J. FRIIS, 1964. Osmotic remedial mutants. A new classification for nutritional mutants in yeast. Genetics 50 : 829-839.

HELMSTETTER, C.E. et S. COOPER, I968. DNA synthesis during the division cycle of rapidly growing Escherichia coli B/r. J.Mol.Biol. 31 : 507-518.

HELMSTETTER, C.E. et O. PIERUCCI. I968. Cell. division during inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. J. Bact. 95 : 1627-1639.

HENNING, U., REHN, K., BRAUN, V. et B. HOHN, 1970. Cell envelope and shape of Escherichia coli K12. Properties of a température-sensitive rod mutant. Eur.J.Biochem. 26 : 570-586.

HENNING, U. et U. SCHWARTZ, 1972. Determinants of cell shape, sous presse.

HIROTA, Y., MORDOH, J. et F. JACOB, 1970. On the process of cellular division in E.coli .III. Thermosensitive mutants of E.coli altered in the process of DNA initiation.J. Mol. Biol. 53 : 369-387.

HIROTA, Y. RYTER, A. et F.JACOB. I968. Thermosensitive mutants of E.coli affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. Cold. Spring.Harbor Symp.Quant.Biol. 33 : 677-693.

HIROTA Y. et M. RICARD, I972. Production of DNA-less bacteria In "Biology and radiobiology of anucleate systems.I" Acad. Press. New-York.

HIROTA, Y., JACOB, F., RYTER, A. BUTTIN G., et T. NAKAI. I968. Asymetrical cell division and production of deoxyribonucleic acid-less bacteria.J. Mol.Biol. 35 : 175-192.

HIROTA, Y., RICARD, M. et B. SHAPIRO, 1971. The use of thermosensitive mutants of E.Coli in the analysis of cell division. In "Biomembranes", vol. 2, ed. by lional Manson, Plenum public.Co.

HIROTA, Y., WAKIL, S. SHAPIRO, B., RYTER, A. HURWITZ, J. et F. JACOB, 1970. Sur un mutant thermosensible d'Escherichia coli présentant des anomalies de la membrane.C.R.Acad.Sci. 269 : 1346-1348.

HIGGINS,M.L. et G.D. SHOCKMANN, 1970. Model for cell wall growth of streptococcus faecalis.J.Bact. 101 : 643-648.

HOFNUNG, M., SCHWARTZ, M. et D. HATFIELD. 1971. Complementation studies in the maltose A region of E.coli K12 genetic map. J. Mol.Biol. 61 : 681-694.

HOWARD-FLANDERS, P., SIMON, E. et L.THERIOT, 1964. A locus that controls filament formation and sensitivity to radiation in Escherichia coli K12 . Genetics 49 : 237-246.

HUANG, M. et J. PITTARD. 1967. Genetic analysis of mutant strains of Escherichia coli requiring p-amino benzoïc acid for growth. J.Bact. 93 : 1938-1942.

INOUYE, M. 1969. Unlinking of cell division from deoxyribonucleic acid replication in a temperature-sensitive deoxyribonucleic acid synthesis mutant of Escherichia coli. J.Bact.99 : 842-850.

INOUYE, M. 1971. Pleiotropic effect of the recA gene of Escherichia coli : uncoupling of cell division from DNA replication. J. Bact. 106 : 531-542.

INOUYE, M. et J.P. GUTHRIE, 1969. A mutation which changes a membrane protein of E.coli. Proc. Natl. Acad.Sci. 64 : 957-961.

ISHIBASHI, M., SOGINO, Y. et Y. HIROTA, 1964 : chromosomal location of thymine and arginine genes in Escherichia coli and an F' incorporating them. J. Bact. 87 554-561.

INOUYE, M. et A.B. PARDEE, 1970. Changes of membrane proteins and their relation to deoxyribonucleic acid.synthesis and cell division of Escherichia coli. J.Biol. Chem. 245 : 5813-5819.

IYER,V.N. et W.SZYBALSKI, 1963. A molecular mechanism of mitomycin action : linking of complementary DNA strands. Proc.Natl. Acad.Sci. 50 : 355-362.

JACOB, F. BRENNER, S. et F. CUZIN, 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol. 28 : 329 : 348.

JACOB, F. et E.L. WOLLMAN, 1961. Sexuality and the genetics of bacteria. Acad. Press. New-York.

KANTOR, J. et R.DEERING. I967. Recovery of division ability in ultra-violet-irradiated Escherichia coli induced by photo-reactivation, photoprotection and liquid holding treatment. J.Bact. 94 : I946-1950.

KIRBY, E.P., JACOB, F. et D.A. GOLDTHWAIT, I967. Prophage induction and filament formation in a mutant strain of Escherichia coli . Proc. Natl.Acad.Sci. 58 : 1903-1910.

KOHIYAMA, M., COUSIN, D., RYTER, A. et F.JACOB, I966. Mutants thermosensibles d'Escherichia coli K12 .I. Isolement et caractérisation rapide. Ann. Inst.Pasteur 110 : 465 - 486.

KORN. D. et M. THOMAS, 1971. Control of plasmid replication in Escherichia coli : correlation of the membrane site of DNA replication with the bacterial segregation unit. Proc. Natl. Acad.Sci. 68 : 2047-2051.

LARK, K.G., 1966..Regulation of chromosome replication and segregation in bacteria. Bact.Rev. 30 : 3 - 32.

LEIGHTON, P.M. et W.D., DONACHIE I970. Deoxyribonucleic acid synthesis and cell division in a lon⁻ mutant of Escherichia coli. J.Bact. 94 : 810-814.

LINDAHL, G., HIROTA, Y. et F.JACOB, 1971. On the process of cellular division in Escherichia coli : replication of the bacterial chromosome under control of prophage P2. Proc.Natl. Acad.Sci. 68 : 2407-2411.

LOW, B. et T.H. WOOD, I965. A quick and efficient method for interruption of bacterial conjugation. Genet.Res. 6 : 300 - 303.

MAALOE, O. et N.O. KJELDGAARD, I966. Control of macromolecular synthesis. W.A. Benjamin, New York.

MOSSER, J.L. et A. TOMASZ, I970. Choline-containing teichoic acid as a structural component of Pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. J.Biol.Chem. 245 : 287-298.

NAGAI, K., KANEKO, H. et G. TAMURA, 1971. Thermosensitive mutants of Escherichia coli requiring new protein synthesis to recover cellular division ability . Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 : 669 - 675.

NAGEL DE ZWAIG, R. et S.LURIA.1967. Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of Escherichia coli. J. Bact. 94 : 1112-1123.

NISHIMURA, Y., CARO, L., BERG, G.M. et Y. HIROTA, 1971. Chromosome replication in Escherichia coli. IV. Control of chromosomereplication and cell division by an integrated episome. J. Mol.Biol. 55 .441-456.

OVERATH, P., HILL, F.F. et I.LAMNECK, 1971. Biogenesis of E.coli membrane : evidence for randomization of lipid phase. Nature New Biol. 234 : 264 - 267.

OVERATH, P., PAULI, G. et H.U. SHAIRER, 1969. Fatty acid degradation in Escherichia coli, and inducible acyl-coA synthetase, the mapping of old-mutations and the isolation of regulatory mutants. Eur.J.Biochem. 7 ! 559-574.

PIECHAUD, M. 1954. La coloration sans hydrolyse du noyau des bactéries. Ann. Inst.Pasteur 86 : 787-793.

PITTARD, J. , LOUTIT, J.S. et E.A. ADELBERG, 1963. Gene transfer by F' strains of Escherichia coli K12 I. Delay in initiation of chromosome transfer.J. Bact. 85 :1394-140I.

REEVES,J. et D.J. CLARK, 1972 : Cell division of Escherichia coli BUG6 : effect of varying the length of growth at the non permissive temperature. J.Bact. 110 : 117-121.

REEVES, J. et D.J. CLARK, 1972. Cell division of Escherichia coli BUG6 : effect of varying the temperature used as the non permissive growth condition.J. Bact. IIO - 122-125.

REEVES, J.D. GROVES, D. et J. CLARK , 1970 . Regulation of cell division in Escherichia coli : characterization of temperature sensitive division mutants.J.Bact. 104 : 1052-1064

RICARD, M. et Y. HIROTA; 1969. Effet des sels sur le processus de division cellulaire d'E.coli. C.R. Acad.Sci. 268 : 1335-1338.

RICARD,M. HIROTA, Y. et F. JACOB, 1970. Isolement de mutants de membrane chez Escherichia coli. C.R. Acad. Sci. 270 : 2591-2593.

RICKENBERG, H.V. COHEN, G., BUTTIN, G. et J. MONOD. 1956. La galactosidase perméase d'Escherichia coli. Ann.Instr.Pasteur 91 : 829 - 857.

ROBINOW, C.F. 1960. In "The cell", ed.by J. Brachet et A.E.Mirsky, vol.4, p.45, Acad.Press. New-York.

RYTER,A. 1968. Association of the nucleus and the membrane of bacteria : a morphological study. Bacteriol. Rev. 32 : 39-54.

RYTER, A. et F. JACOB, 1966. Etude morphologique de la liaison du noyau à la membrane chez E.coli et chez les protoplastes de B.subtilis. Ann. Inst.Pasteur 110. : 801-812.

RYTER, A. et E. KELLENBERGER, 1958. Etudes au microscope électronique de plasmas contenant de l'ADN.I. Les nucléoïdes de bactéries en croissance exponentielle. Z.Naturforsch. 13 : 597-605.

SCHWARZ, U., ASMUS ,A. et H. FRANK, 1969. Autolytic enzymes and cell division of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 41 : 419-429.

SCHWARZ, U. et W. LEUTGEB. 1971. Morphogenetic aspects of murein structure and biosynthesis. J.Bact. 106 : 588-595.

SCHWARTZ, M. 1967. Expression phénotypique et localisation génétique de mutations affectant le métabolisme du maltose chez Escherichia coli K12. Ann. Inst.Pasteur 112 : 673-700.

SHAPIRO, B.M., SICCARDI, A., HIROTA, Y. et F. JACOB, 1970. On the process of cellular division in Escherichia coli. II. Membrane protein alterations associated with mutations affecting the initiation of DNA synthesis. J. Mol. Biol. 52 : 75-89.

SHIBA, S., TERAWAKI, A., TAGUCHI, T. et J. KAWAMATA, 1959. Selective inhibition of formation of deoxyribonucleic acid in Escherichia coli. Nature 183 : 1056-1057.

SHIMAZU, Y., MORIMYO, M. et K. SUZUKI, 1971. Temperature-sensitive recovery -mutant of Escherichia coli K12 irradiated with ultraviolet light. J.Bact. 107 : 623-632.

SICCARDI, A., SHAPIRO, B.M., HIROTA, Y. et F. JACOB, 1971. On the process of cellular division in Escherichia coli. IV. Altered protein composition and turnover of the membrane of thermosensitive mutants defective in chromosomal replication. J.Mol.Biol. 56 : 475-490.

SMITH, D.W. et P.C. HANAWALT. 1967. Properties of the growing-point region in the bacterial chromosome. Biochem.Biophys. Acta 149 : 519-531.

STARKA,J. et J. MORAVOVA, 1967. Phospholipids and cellular division of Escherichia coli. J. Folia Microbiol. 12. : 240.

SUEOKA, N. et W.C. QUINN, 1968. Membrane attachment of the chromosomes replication origin in Bacillus subtilis. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 33 : 695-705.

SWANSON,I., HSU, K.C. et E.C. GOTTSCHLICH, 1969. Electron microscopic studies on Steptococci I.M. antigen. J. Exptl. Med. 130 : 1063-1075.

TAYLOR, A.L. et E.A. ADELBERG, 1960. Linkage analysis qith very high frequency males of Escherichia coli. Genetics 45 : 1233-1243.

THOMAS, C.A. et J. ABELSON, 1965. The isolation and characterization of DNA from bacteriophage. In "Procedures in nucleic acid research", p. 553-561.

VAN DE PUTTE, P., VAN DILLEWIJN, J. et A. RORSH. 1964. The selection of mutants of Escherichia coli with impaired cell division at elevated temperature. Mut.Res. I : 121-128.

WALKER, J.R. et A.B. PARDEE, 1967, Conditional mutants involving septum formation in Escherichia coli. J.Bact. 93 : 107-114.

WABER, G. et L.E.YOUNG, 1964. Fragmentation of bovine serum albumine by pepsine. I. The origin of the acid expansion of the albumine molecules.J.Biol.Chem. 239 : 1415-1423.

WEISSBACH, A. et A. LYSIO, 1965. Alkylation of nucleic acids by mytomycin C and L. porfiromycin. Biochem. 4 : 196-200.

WIJSMAN, H.J.W. 1970. Een genetische studie over de celwandsynthese bij Escherichia coli. Academish Proefschrift Drukkerij, Wed. G. van Soest. N.V. Amsterdam.

WITKIN, E. 1967. The radiation sensitivity of Escherichia coli B : a hypothesis relating filament formation and prophage induction. Proc. Natl.Acad.Sci. 57 : 1275 - 1279.

WRIGHT, M. 1971. Mutants of E.coli lacking endonuclease I, ribonuclease I or ribonuclease II. J. Bact. 107 : 87 - 94.

WRIGHT, M., HURWITZ, J. et G. BUTTIN, 1971. The isolation and characterization from Escherichia coli of an ATP dependent deoxyribonuclease directed by recB, C genes. J.Biol.Chem. 246, 6543-6555.

YOSHIKAWA, H., O'SULLIVAN, A. et N. SUEOKA, 1964. Sequential replication of the Bacillus subtilis chromosome. III. Regulation of initiation. Proc.Natl.Acad. Sc. 52 : 973-980.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier ici Monsieur François JACOB qui m'a accueilli dans son service et permis d'exercer un métier. Je lui suis reconnaissant d'avoir donné son orientation à mon travail et de l'avoir guidé par la suite avec une grande clairvoyance. J'ai été sensible à la bienveillance qu'il m'a manifestée.

Je remercie Y. HIROTA de m'avoir appris ce que j'ai pu apprendre dans le domaine de la recherche expérimentale et d'avoir suivi mon travail avec une attention jamais démentie.

Mes remerciements vont à ceux qui ont été mes compagnons de travail pendant ces années passées à l'Institut Pasteur, principalement à Chantal Barnoux, Marie-Claude Moreau et Paulette Vauglin, à tous ceux également avec qui j'ai pu nouer des relations amicales.

Je ne saurais oublier Chantal Maczuka dont la constante gentillesse a fait de la réalisation pratique de cette thèse un véritable plaisir.

J'exprime ma gratitude à Messieurs Gérard BUTTIN et Jean-Marie DUBERT pour le temps gracieux qu'ils ont consacré à l'examen de ce travail.